

Tesis de Posgrado

Mecanismos de transducción de receptores de hormonas proteicas : Relación entre sistemas adenilato ciclasa dependientes e independientes

Dada, Laura Andrea

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Dada, Laura Andrea. (1996). Mecanismos de transducción de receptores de hormonas proteicas : Relación entre sistemas adenilato ciclasa dependientes e independientes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2826_Dada.pdf

Cita tipo Chicago:

Dada, Laura Andrea. "Mecanismos de transducción de receptores de hormonas proteicas : Relación entre sistemas adenilato ciclasa dependientes e independientes". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2826_Dada.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Tema de Tesis: Mecanismos de transducción de receptores de hormonas proteicas. Relación entre sistemas adenilato ciclasa dependientes e independientes.

Autor: Licenciada LAURA ANDREA DADA

Director de Tesis: Profesor Doctor ERNESTO JORGE PODESTA

Lugar de Trabajo: Departamento de Bioquímica Humana. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires.

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

1996

h. 2

A Jorge, mis padres y mi familia.

Agradecimientos.

Quiero agradecer particularmente al Dr. Ernesto Podestá, que fue mi jefe y director, por mi formación científica, por la confianza que me tuvo desde el primer momento, por escuchar mis disidencias y por su permanente apoyo.

Este estudio fue realizado en el departamento de Bioquímica Humana de la Universidad de Buenos Aires, deseo agradecer a sus autoridades el haberme brindado un ámbito donde formarme y desarrollarme profesionalmente.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. B. Schimmer por habernos facilitado las células Y₁. Quiero agradecer particularmente a la Dra. Stella Campo por prestarnos el trazador de progesterona en algunos terribles momentos y por su excelente predisposición a colaborar con nosotros cada vez que necesitamos algo. De igual manera quiero agradecer al personal del CEDIE, donde se iniciaron estos estudios, que me brindaron su ayuda desinteresadamente cada vez que la necesité.

Deseo agradecer al Dr. Carlos Lantos, mi consejero por su permanente estímulo.

Deseo expresar mi agradecimiento a Susana Mancini, bibliotecaria del CEDIE, por haberme permitido utilizar la biblioteca en todo momento y por haberme ayudado siempre con las búsquedas bibliográficas.

Quiero agradecer también:

A Pablo Mele por su invaluable ayuda en la realización de los dibujos y por su colaboración en algunos experimentos.

A Fabiana Cornejo, por ser una excelente compañera, por haberme escuchado siempre y por los acentos.

A Cora Cymeryng, por sus consejos, por nuestras peleas y por haber soportado estoicamente mi desorden.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Moira Alloati, Carla Finkelstein, Carlos F. Mendez, Isabel Neuman, Cristina Paz por todos los gratos momentos que compartimos. A Irene, que se encargó siempre de tener el material listo cuando se necesitaba.

A mis amigos Horacio Nastri, Marisa Ramirez Pablo Visconti, Mercedes Sanchez y Ruth Rosenstein que siempre estuvieron a mi lado. Especialmente a mi amigo Marcelo de Las Heras por haberme ayudado, escuchado y apoyado cada vez que lo necesité.

A mis amigas las "brujas" por hacerme reír en el café de la mañana y por compartir conmigo sus problemas, dudas y frustraciones.

A mis padres y a mis hermanos por el apoyo y la ayuda que me dieron siempre.

A mi esposo, Jorge, que compartió conmigo todo lo bueno y lo malo de estos últimos años.

Finalmente, a mis hijos Tomás y María Eugenia porque gracias a ellos entendí que el futuro puede ser mejor.

INDICE

	Página
Capítulo I: Introducción	1
Sección I: Introducción	
1: La comunicación inter e intracelular.	2
Sección II: Síntesis y estructura de las hormonas esteroides.	
1: Generalidades.	6
2: La glándula adrenal.	6
3: El testículo.	10
4: Biosíntesis de esteroides.	13
Sección III: Mecanismo de acción de hormonas.	
1: Adrenocorticotrofina hipofisaria	16
a) Síntesis y liberación.	16
b) Relación estructura-actividad.	17
c) Caracterización del receptor de ACTH.	18
d) Sistema de transducción intracelular.	19
e) Regulación del paso limitante de la esteroidogénesis, conversión de colesterol en pregnenolona.	26
f) Rol del calcio.	32
2: Hormona Luteinizante.	34
a) Generalidades.	34
b) Caracterización del receptor de LH.	35
c) Sistema de transducción intracelular.	36
3: Angiotensina II.	37
a) Generalidades	37
b) Caracterización del receptor de AII.	39
c) Generación de mensajeros intracelulares.	40
d) Rol del calcio.	44
e) Participación de la PKC.	46

f) Regulación del paso limitante de la esteroidogénesis, conversión de colesterol en pregnenolona.	49
4: Potasio.	50
Sección IV: Bioquímica del ácido araquidónico; metabolismo, regulación y participación en la función celular.	
1: Síntesis de AA.	52
2: Regulación de la liberación de AA.	52
3: Metabolismo del AA	58
4: Rol de los metabolitos del AA en la esteroidogénesis.	61
Sección V: Objetivos del presente trabajo.	65
Capítulo II: Materiales y métodos.	67
Sección I: Materiales.	
1: Materiales.	68
2: Animales.	70
Sección II: Obtención y estimulación de fracciones subcelulares de glándula adrenal.	
1: Obtención de ZF y ZG de adrenal de rata.	71
2: Estimulación de ZF y ZG <i>in vivo</i> por acción de ACTH.	71
3: Estimulación de la ZG y la ZF <i>in vitro</i> por acción de ACTH y All.	72
4: Homogeneización de ZF y ZG.	73
5: Fraccionamiento subcelular.	73
Sección III: Ensayo para la medición de actividades esteroidogénicas en las distintas fracciones subcelulares.	
1: Incubación de las distintas fracciones subcelulares.	76
2: Cálculo para la producción neta de P ₄ en el ensayo libre de células.	80
Sección IV: Producción de factores esteroidogénicos por estimulación con AMPc en el ensayo libre de células.	

1: Descripción de las células Y ₁ . Obtención de células mutantes. Producción de factores esteroideogénicos en células Y ₁ .	
2: Producción in vitro de factores esteroideogénicos por estimulación con AMPc en glándulas adrenales de rata.	83
Sección V: Aislamiento de células esteroideogénicas y determinación de esteroides post-estimulación.	
1: Obtención de células de corteza adrenal de rata. Zona fasciculata y reticularis.	84
2: Obtención de células intersticiales testiculares.	85
3: Incubación de ZF adrenal y de células de Leydig con inhibidores de la fosfolipasa A ₂ y de la lipoxigenasa.	87
Sección VI: Determinación de esteroides por radioinmunoensayo.	
1: RIE de corticosterona.	90
2: RIE de aldosterona.	90
3: RIE de progesterona.	91
1: RIE de testosterona.	92
Sección VI: Producción de AA por células de ZF de corteza adrenal.	
1: Incorporación de AA radiactivo.	93
2: Extracción y cromatografía de lípidos.	93
3: Extracción de fosfolípidos.	95
4: Cromatografía de fosfolípidos.	95
Sección VII: Análisis estadístico	96
Capítulo III: Resultados.	97
Sección I: Producción de esteroides a través de caminos dependientes e independientes de AMPc.	
1: Introducción.	98
2: Recombinación heteróloga de factores esteroideogénicos producidos en ZF y ZG de la corteza adrenal.	105
Sección II: Metabolito común estimulador de la esteroideogénesis	

mitochondrial en diferentes sistemas.	
1: Introducción.	109
2: Estudio del rol del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroidogénesis adrenal.	112
Sección III: Integración del estímulo AMPc-PKA-AA en la cascada de eventos hormono-dependientes.	
1: introducción	137
2: Estimulación de células Y_1 (kin^-) e Y_1 (cyc^-) con ACTH y 8-Br AMPc.	138
3: Efecto del inhibidor de PKA en el ensayo libre de células.	143
4: Producción de factores esteroidogénicos <i>in vitro</i> por AMPc.	146
5: Integración del AA en la cascada de eventos hormono-dependientes.	150
6: Estimulación de la esteroidogénesis en un sistema de recombinación <i>in vitro</i> por acción de ácido araquidónico.	160
Capítulo IV: Discusión	165
Capítulo V: Bibliografía	186

ABREVIATURAS.

- AA: ácido araquidónico.
- ACTH: adrenocorticotrofina, hormona adrenocorticotrófica.
- All: angiotensina II
- AMP_c: 3 '5' adenosina-monofosfato cíclico
- 8-BrAMP_c: 8 - bromo AMP_c.
- db-AMP_c: dibutilil - AMP_c
- mb-AMP_c: monobutilil - AMP_c
- BSA: albúmina de suero bovino.
- BPB: bromuro de bromofenacilo.
- CaM: calmodulina
- Cit P450_{scc}: complejo enzimático citocromo P450 que cliva la cadena lateral del
colesterol.
- CO: cicloxigenasa.
- CS: citosol obtenido de células no estimuladas.
- CSA: citosol obtenido post estimulación hormonal.
- DE₅₀: dosis efectiva media
- DG: diacilglicerol.
- DI₅₀: dosis inhibitoria media.
- DS: desviación estandar.
- EDTA: ácido etiléndiamino tetracético.
- EGTA: ácido etilénglicol - bis (β-aminoetil eter) tetracético.
- ESCULETINA: 6, 7 dihidroxicumarina.
- ETYA: ácido 5, 8, 11, 14 - eicosatetraínoico.

- FSH: hormona folículo estimulante.
- Gi: proteína que une nucleótidos de guanina inhibitoria
- Gs: proteína que une nucleótidos de guanina estimulatoria
- HETE: ácido hidroxieicosatetraenoico.
- HPETE: ácido hidroxiperoxieicosatetraenoico.
- hCG: gonadotrofina coriónica humana
- IP₂: inositol 1,4 difosfato.
- IP₃: inositol 1,4,5 trifosfato.
- KRBGA: buffer Krebs Ringer suplementado con glucosa 0,01 M y BSA 0.05%.
- LH: hormona luteinizante.
- LO: lipoxigenasa.
- LPC: lisofosfatidilcolina
- LTA₄: leucotrieno A₄.
- LTB₄: leucotrieno B₄.
- M199: medio de cultivo M199.
- MIX: 3-isobutil-1-metilxantina.
- MP: fracción microsomal, sedimento de 105.000 xg
- NADPH: nicotinamida dinucleótido fosfato reducido.
- NDGA: ácido nordihidroguayarético.
- P₅: pregnenolona.
- P₄: progesterona.
- PA: ácido fosfatídico.
- PBS: solución fosfosalina.
- PC: fosfatidilcolina.
- PE: fosfatidiletanolamina.

- PG: prostaglandina.
- PI: fosfatidilinositol.
- PIP: fosfatidilinositol 4 fosfato.
- PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 difosfato.
- PKA: quinasa de proteínas dependiente de AMP_C.
- PKC: quinasa de proteínas dependiente de Ca⁺⁺ y fosfolípidos.
- PKI: inhibidor de la proteína quinasa dependiente de AMP_C.
- PLA₁: fosfolipasa A₁.
- PLA₂: fosfolipasa A₂.
- PLC: fosfolipasa C.
- PLD: fosfolipasa D.
- PMTS: sobrenadante post - mitocondrial obtenido de células no estimuladas.
- PMTSA: sobrenadante post-mitocondrial obtenido post-estimulación
- Proteína G: proteína que une nucleótidos de guanina.
- PS: fosfatidilserina.
- RE: retículo endoplasmático.
- RIE: radioinmunoensayo o radioinmunoanálisis.
- ZF: zona fasciculata.
- ZG: zona glomerulosa.

Capítulo I:

INTRODUCCION

SECCION I: INTRODUCCION.

I-1: La comunicación inter e intracelular.

Las células vivas, desde los organismos unicelulares tales como las bacterias hasta cada una de las células que conforman los complejos organismos superiores, incluyendo los humanos, tienen la necesidad común de reconocer el medio ambiente que las rodea y responder a él apropiadamente. Distintos estímulos presionan permanentemente a la célula, y ésta debe adaptarse para sobrevivir. Es lógico pensar que cuanto mayor sea la capacidad celular para adaptarse al medio ambiente, más amplia será la posibilidad de supervivencia.

Los organismos unicelulares son capaces de realizar todas las funciones necesarias para mantener la vida; la célula puede incorporar nutrientes del medio ambiente, moverse y llevar a cabo reacciones metabólicas que la proveen de energía y le permiten sintetizar nuevas moléculas para sobrevivir y reproducirse, mientras que la relación entre cada uno de los miembros de la población es escasa. En este caso las comunicaciones intercelulares están casi exclusivamente limitadas a un intercambio de la información química, sea mediada por transferencia cromosómica directa o bien por agentes virales.

En los organismos multicelulares la situación es mucho más compleja. Las distintas funciones se distribuyen en poblaciones celulares, organizadas en órganos y tejidos. Para coordinar las distintas funciones existen mecanismos, mediante los cuales, las células individualmente o agrupadas pueden comunicarse con otros grupos celulares.

En los organismos superiores existen diversos métodos de comunicación entre células. Existe, por ejemplo, una forma de transmisión directa de célula a

célula, mediada por el contacto entre ellas; este tipo de interrelación está mediado por estructuras de naturaleza glicoproteica y en última instancia, sería el responsable del comportamiento social de las células (por ejemplo: la inhibición de crecimiento por contacto). Otros métodos de comunicación incluyen las hormonas circulantes y la neurotrasmisión. La principal diferencia entre estos dos sistemas se encuentra en su direccionalidad. Las neuronas envían mensajes discretos a un grupo específico de células blanco, ya sea células musculares, secretorias u otras células nerviosas. Este tipo de comunicación intercelular tiene lugar en sitios específicos denominados sinapsis.

La forma más extendida de comunicación hormonal es el sistema endócrino, aunque existen los mecanismos autócrinos y parácrinos. Para poder actuar sobre una célula, tanto las hormonas como los neurotransmisores deben en primer lugar ser reconocidos. Clásicamente se ha denominado receptor a una macromolécula capaz de unir selectiva y específicamente sustancias biológicamente activas, produciendo una respuesta fisiológica como resultado de esa interacción. Para algunas hormonas el receptor es intracelular, la señal, una hormona esteroidea por ejemplo, atraviesa la membrana celular y se une a su receptor. En este caso, la formación del complejo hormona - receptor llevará a cambios en el material genético de la célula y consecuentemente, cambiará la síntesis de proteínas específicas. Se postula que esto ocurre porque al ser los esteroides moléculas lipofílicas pueden atravesar las biomembranas, sin embargo no se puede descartar la existencia de algún componente que facilite el transporte de los esteroides al interior de la célula.

Otros tipos de señales son hidrosolubles y no pueden pasar a través de las membranas celulares. Se ha descrito que los receptores para estas moléculas se hallan localizados en la membrana plasmática. Estos receptores tienen tres

dominios: uno, extracelular, otro que atraviesa la membrana y un tercero intracelular. Generalmente cuando una señal se une a la porción extracelular del receptor, este cambiaría su configuración de manera tal de disparar mecanismos que traducen las señales externas en otras internas, mediadas estas por los denominados segundos mensajeros.

En términos moleculares, el proceso depende de una serie de proteínas de la membrana celular, cada una de las cuales transmite información induciendo un cambio conformacional en la proteína adyacente. En algún punto la información se traduce en una molécula de pequeño tamaño, o en flujo orientado de iones, que aumenta su concentración en el interior celular. Constituyen estos los segundos mensajeros, cuya difusión permite que la señal se propague rápidamente por toda la célula.

Los estudios intensivos sobre el metabolismo, función y mecanismo de acción de estos segundos mensajeros han contribuido al establecimiento de una red conceptual, la cual describe el proceso estímulo-respuesta como una serie de reacciones denominada cascada de señales, que convierten los estímulos externos en segundos mensajeros intracelulares, a partir de estos, actividades enzimáticas regulatorias dependientes de los mensajeros, y finalmente la respuesta celular correspondiente. Esta red conceptual se ha utilizado con éxito para interpretar la acción de un número sorprendentemente grande de efectores celulares sobre la base de relativamente pocos segundos mensajeros. La información que se expone en las secciones siguientes intenta resumir los conocimientos actuales sobre la regulación hormonal de la síntesis de esteroides y los diferentes mecanismos intracelulares de transducción de señales involucrados en dicho sistema.

El objetivo de esta tesis es estudiar, usando como modelo la regulación hormonal de la síntesis de esteroides la interrelación entre distintas señales intracelulares activadas por diferentes receptores.

SECCION II: SINTESIS Y ESTRUCTURA DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS.

II-1: Generalidades.

El colesterol es el precursor de las cinco clases principales de hormonas esteroideas: progestágenos, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos (figura 1).

Los principales lugares de síntesis de estas clases de hormonas son: progestágenos, cuerpo lúteo; estrógenos, ovario; andrógenos, testículo; glucocorticoides y mineralocorticoides, corteza adrenal.

A continuación se describirá la glándula adrenal y el testículo porque son los órganos esteroideogénicos a los que nos referiremos en el presente trabajo.

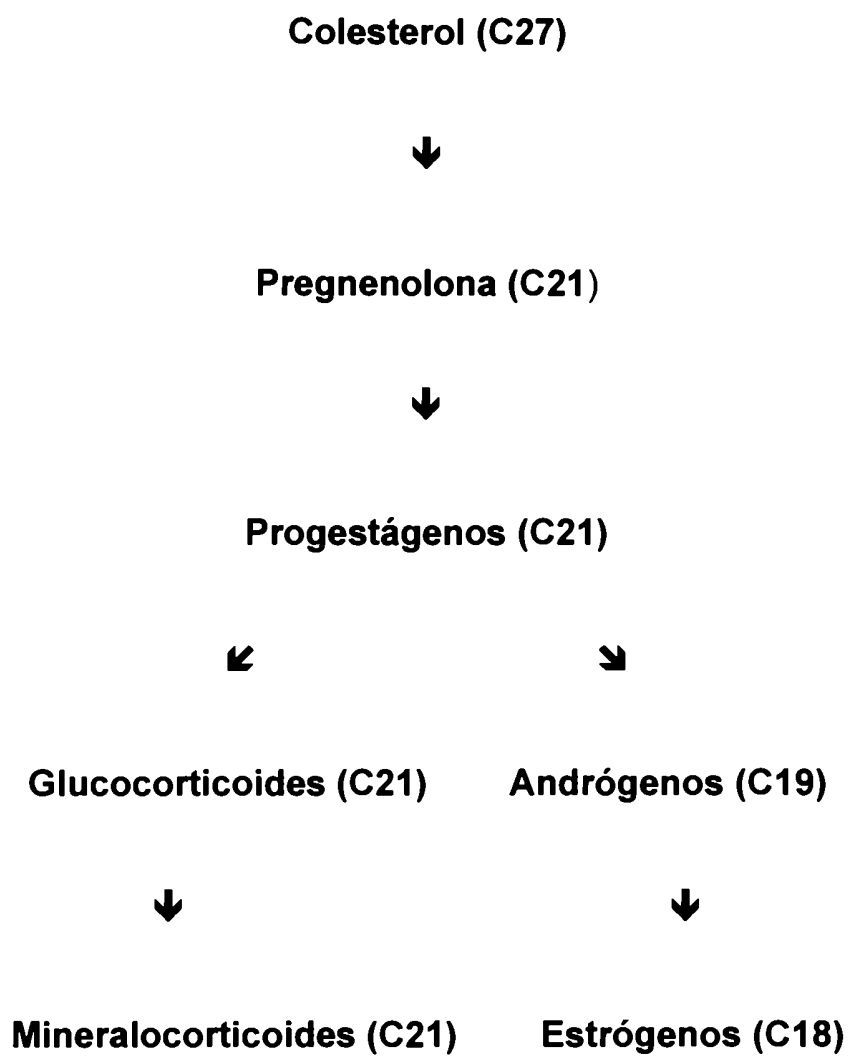
II-2: La glándula adrenal.

Las glándulas suprarrenales de los mamíferos son estructuras pares, que se sitúan por encima del polo superior de los riñones. Estas glándulas constan de dos estructuras aparentemente sin relación embriológica, histológica ni funcional: la corteza externa y la médula central.

La corteza es de origen mesodérmico, derivada de la porción ventral del epitelio celómico, y la médula proviene de células ectodérmicas.

La división de la corteza adrenal de los mamíferos en tres zonas concéntricas fue propuesta por Arnold en 1866 (Arnold, 1866), quien dio a estas zonas los nombres ahora comúnmente usados: zona glomerulosa, zona fasciculata y zona reticularis. Arnold basó su descripción en la estructura de fibras de tejido

FIGURA 1: Relaciones biosintéticas de las hormonas esteroideas.



conectivo y de vasos sanguíneos de la corteza. Esta subdivisión en zonas se observa más claramente en las suprarrenales que contienen abundantes inclusiones lipídicas, como las del hombre y la rata.

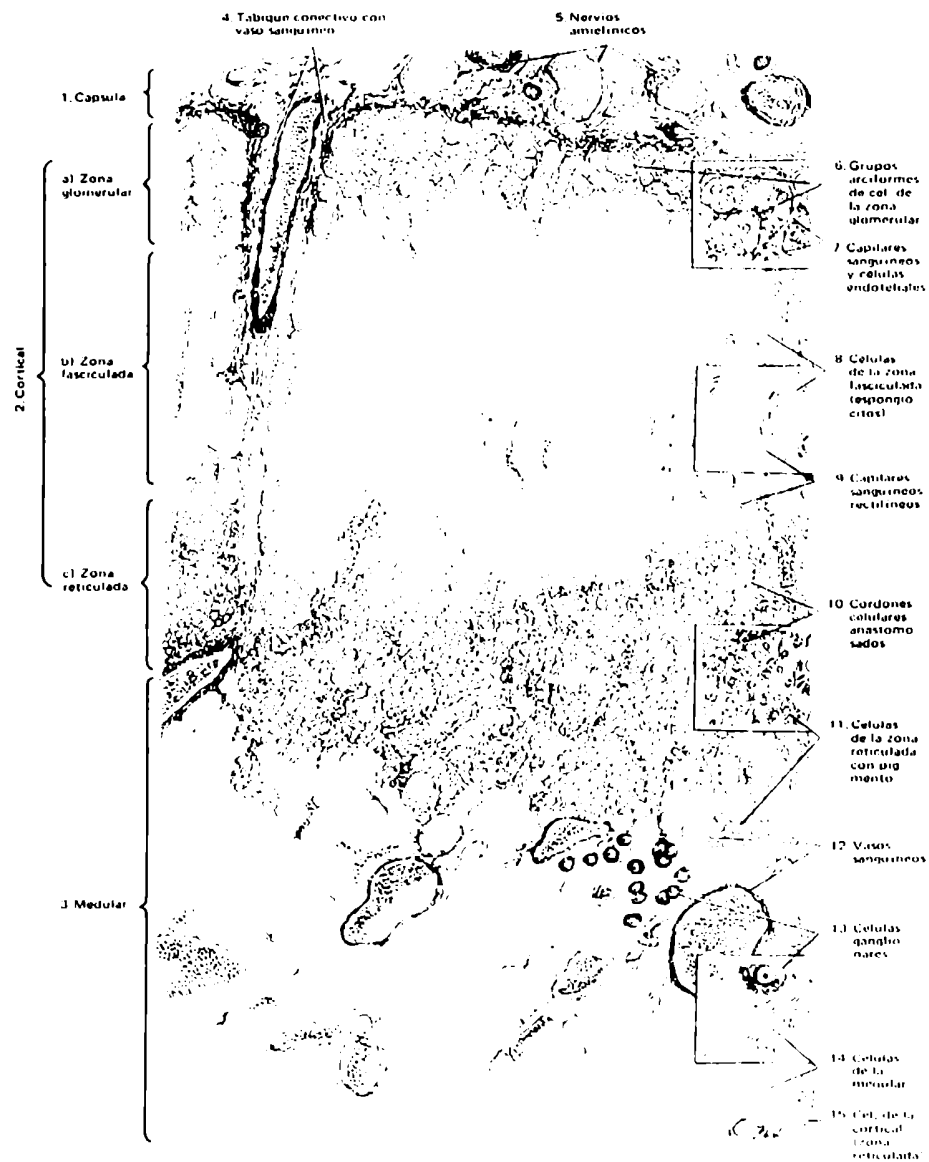
En un corte transversal de la glándula suprarrenal (figura 2) , se observa en la parte externa, una cápsula de tejido conectivo compuesta de fibras colágenas paralelas a la superficie del órgano. Por dentro, aparece la zona glomerulosa que es la más fina y cuyas células están unidas débilmente entre sí formando racimos.

La capa siguiente es la zona fasciculata que es la de mayor espesor y consta de células agrupadas en columnas paralelas que se extienden desde la zona glomerulosa hasta la reticular. Sus células, en la rata, contienen un número variable de vacuolas lipídicas distribuidas entre las grandes mitocondrias redondeadas y agrupadas. La estructura central de las mitocondrias varía pero generalmente están coronadas por perfiles redondeados formados por una población uniforme de crestas. Las vacuolas forman un tipo de retículo endoplasmático semejante a un panal con numerosas partículas de ribonucleoproteínas (Luse, 1967).

Por último, la capa adyacente a la médula es la zona reticularis. Sus células se ubican de manera irregular, poseen gotas lipídicas y están considerablemente pigmentadas, con núcleo frecuentemente picnótico.

En la corteza adrenal la zona glomerulosa secreta los mineralocorticoides aldosterona y 11- desoxicorticosterona. La zona fasciculata y la zona interna secretan predominantemente los glucocorticoides: cortisol en el hombre y corticosterona en la rata y andrógenos principalmente androstenediona y dehidroepiandrosterona.

Mientras que la esteroidogénesis en las zonas fasciculata y reticularis está regulada predominantemente por la hormona adenocorticotrópica (ACTH), en la

FIGURA 2: Glándula adrenal.

Coloración hematoxilina - eosina 200x.

(Fuente: Nuevo Atlas de Histología. M. Fiore, R. Mancini y E. de Robertis.

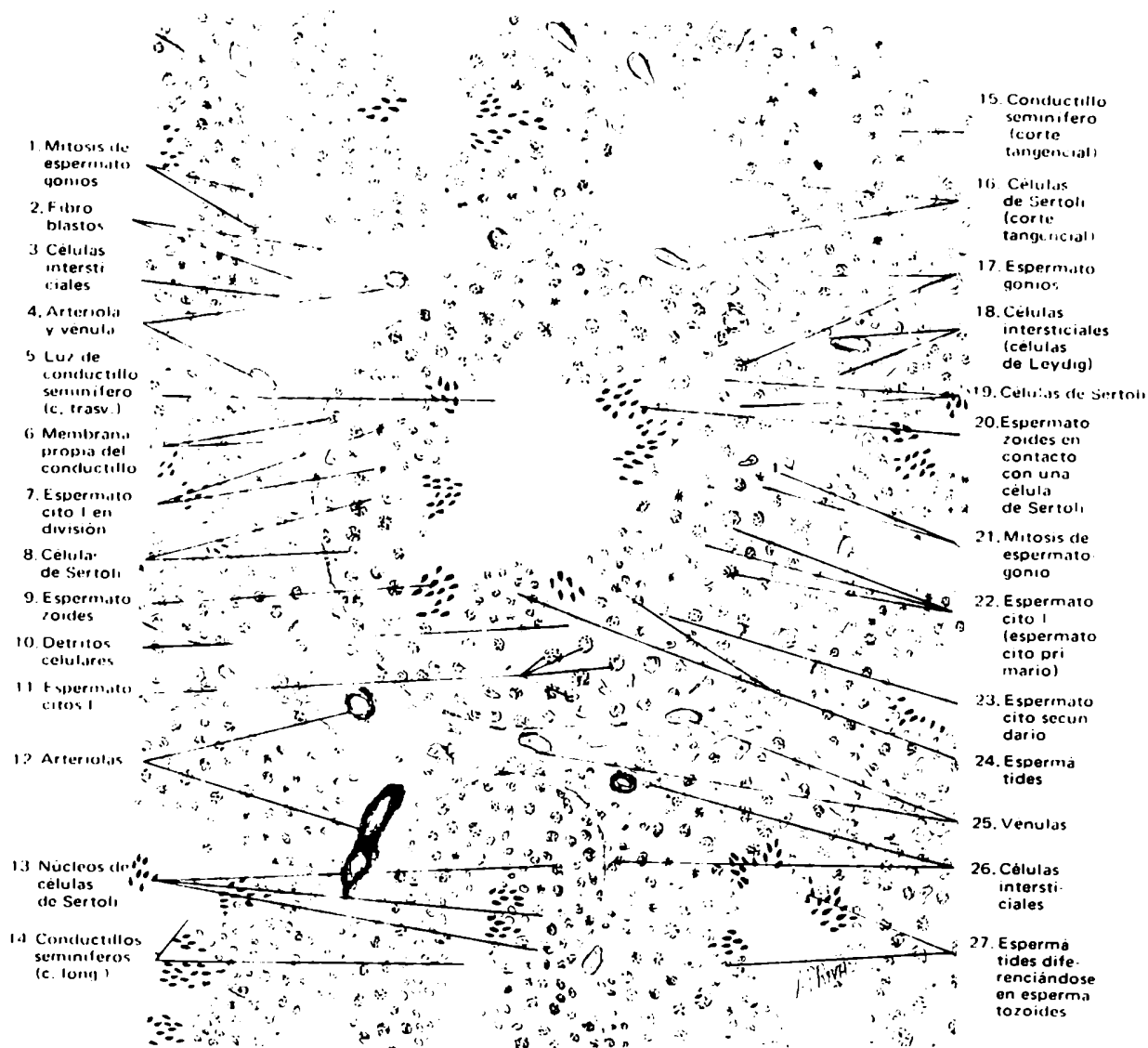
Editorial El Ateneo)

zona glomerulosa la esteroidogénesis está principalmente estimulada por angiotensina II (All), siendo también regulada por ACTH y potasio. Además de la activación aguda de la esteroidogénesis (minutos), ACTH actúa crónicamente (horas o días) produciendo efectos sobre la expresión genética de las enzimas esteroidogénicas y, más aún, regula la capacidad esteroidogénica de este tejido. En el presente trabajo se estudiarán los efectos agudos de el ACTH.

II-3: El testículo.

El testículo es un órgano encapsulado que en la mayoría de los casos se encuentra ubicado en el saco escrotal. Se halla compuesto por una serie de túbulos separados por una trama de tejido intersticial. Los túbulos seminíferos poseen un diámetro de 200 a 250 μm y su número varía desde 30 en la rata hasta más de 1000 en el hombre. En la mayoría de los mamíferos el proceso de espermatogénesis ocurre dentro de los tubos seminíferos, los cuales se abren hacia la *rete testis* que está conectada con el epidídimo (figura 3).

El análisis histológico del tubo seminífero revela la existencia de diferentes tipos celulares cuya distribución varía tanto espacial como temporalmente. Entre éstos las células de Sertoli se extienden desde la membrana basal hacia el lumen, y forman entre sí uniones estrechas. En íntimo contacto con estas células se distinguen las células germinales que darán origen, a través de una compleja serie de transformaciones (espermatogénesis), a los espermatozoides capaces de ser transportados hacia las vías eferentes (Fawcett, 1975).

FIGURA 3: Corte transversal del testículo.

Coloración: hematoxilina-eosina 300x.

(Fuente: Nuevo Atlas de Histología. M. Fiore, R. Mancini y E. de Robertis.

Editorial El Ateneo).

El tejido intersticial ocupa el espacio entre túbulos adyacentes, y contiene todos los vasos sanguíneos y linfáticos del parénquima testicular. El tipo celular más importante en este espacio es el formado por las células de Leydig, cuya función principal es la de sintetizar y segregar andrógenos que regulan la espermatogénesis, el desarrollo y el mantenimiento de todo el tracto genital masculino, como también el de las características sexuales externas (Mooradian y col. 1987). La actividad esteroideogénica y secretoria de las células de Leydig es revelada por la presencia de un retículo endoplasmático y un aparato de Golgi altamente desarrollados, y numerosas gotas lipídicas y lisosomas (Christensen, 1975). El intersticio presenta además un número apreciable de células precursoras ("mast cells") y macrófagos.

La actividad esteroideogénica de las células de Leydig presenta un perfil bifásico durante el desarrollo. En la vida embrionaria, las células de Leydig aumentan en número y tamaño y sus secreciones estimulan la diferenciación del tracto genital masculino. Luego de este período, las células involucionan y se mantienen en regresión hasta la pubertad, etapa en que aparecen las células responsables de mantener el trofismo de los órganos sexuales accesorios durante la vida adulta.

Las gonadotrofinas hipofisarias son las principales reguladoras de la función testicular, en particular la hormona folículo estimulante (FSH), junto con los andrógenos en las células de Sertoli (Means, 1975), y la hormona luteinizante (LH) sobre las células de Leydig (Eik-Nes, 1975).

Si bien las gonadotrofinas hipofisarias son esenciales para el desarrollo y/o mantenimiento de la actividad testicular, estudios recientes demuestran la existencia de numerosos productos secretorios, de tipos celulares testiculares específicos los

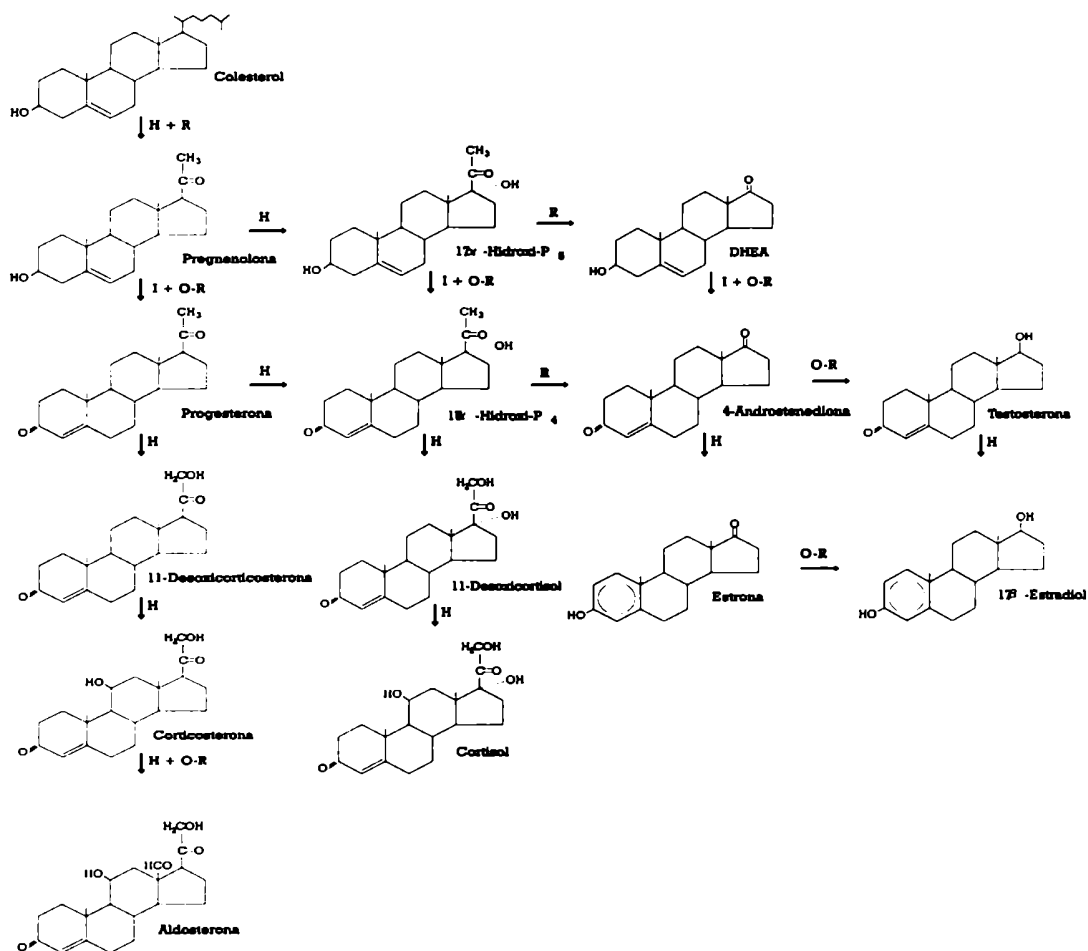
cuales tienen acción directa o indirecta sobre otro tipo celular testicular. Se han descrito interacciones Sertoli - germinal, Sertoli - Leydig, Sertoli - mioide, y Leydig - mioide (Skinner, 1991); lo cual implica a las interacciones parácrinas para el mantenimiento de la función testicular.

II-4: Biosíntesis de esteroides.

El paso limitante de la esteroidogénesis es la transformación mitocondrial del colesterol poco difusible en los subsecuentes esteroides difusibles. Antes de este paso, la pobre solubilidad del colesterol en el medio acuoso requiere de diversos sistemas de transporte para su movilización intracelular hacia y dentro de la mitocondria.

El primer paso en la síntesis de hormonas esteroides es la remoción de seis átomos de carbono de la cadena lateral del colesterol para formar pregnenolona (P_5 , fig. 4) y aldehído isocaproico. La reacción de clivaje de la cadena lateral del colesterol utiliza tres proteínas diferentes e implica la transferencia de electrones del NADPH mitocondrial por una flavoproteína (adrenodoxina reductasa) a una proteína que contiene hierro y azufre (adrenodoxina). Estas enzimas están localizadas en la matriz mitocondrial. Luego, la adrenodoxina transfiere los electrones al citocromo P450 que cliva la cadena lateral del colesterol, Cit P450_{scc}, localizado en la cara interna de la membrana interna de la membrana mitocondrial. Esta enzima cataliza el pasaje de colesterol a P_5 utilizando tres moléculas de oxígeno molecular y tres moléculas de NADPH; las dos primeras moléculas de oxígeno se utilizan para las hidroxilaciones secuenciales en las posiciones 20 y 22 (Simpson y Waterman, 1988)

FIGURA 4: Biosíntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol.



Referencias: H: hidroxilación, O-R: óxido/reducción, R: ruptura de la cadena hidrocarbonada, I: isomerización, DHEA: dihidroepiandrosterona.

La tercera molécula de oxígeno es requerida para un clivaje aún no caracterizado de la unión carbono-carbono entre estos dos átomos.

La progesterona (P_4) se sintetiza a partir de P_5 en dos pasos: el grupo hidroxilo de P_5 es oxidado a un grupo ceto en C3 y el enlace Δ^5 es isomerizado a una unión Δ^4 .

Existen dos vías principales para la biosíntesis de cortisol (fig. 4), una vía P_4 (camino Δ^4) y otra vía 17-OH- P_5 (camino Δ^5).

El paso inicial para la síntesis de aldosterona, el principal mineralocorticoide, es la hidroxilación de P_4 en el C21 (camino Δ^4).

Los andrógenos son moléculas con 19 átomos de carbono. La síntesis de andrógenos comienza con la hidroxilación de P_4 en el C17. La cadena lateral que contiene C20 y C21 es entonces clivada para dar androstenediona, un andrógeno (figura 4). La testosterona, otro andrógeno, es formado por reducción del grupo ceto de la androstenediona (figura 4).

Los estrógenos se forman a partir de los andrógenos por pérdida del grupo metilo en C19 y la formación de un anillo aromático (figura 4).

SECCION III: MECANISMO DE ACCION DE HORMONAS.

III-1: Adrenocorticotrofina hipofisaria.

a) Síntesis y liberación.

La hormona adrenocorticotrófica es sintetizada y secretada por la adenohipófisis. Es un polipéptido constituido por 39 aminoácidos. Un estímulo que alcanza la corteza cerebral relaja la inhibición sostenida de la formación reticular o del sistema límbico sobre los centros hipotalámicos en el núcleo tuberoinfundibular, produciéndose el factor liberador de corticotrofina. Este actúa sobre células basófilas de la glándula hipofisaria anterior y sobre algunas células cromóforas gigantes liberando ACTH, que actúa a su vez sobre varios tejidos, incluyendo la corteza adrenal, donde estimula la síntesis de esteroides, el tejido adiposo y el cerebro.

Observaciones experimentales demostraron que el tiempo entre la aplicación de un estímulo y el incremento en la secreción de ACTH es extremadamente corto; en la rata, los niveles de plasmáticos de ACTH se encuentran elevados dentro de los 2 minutos (Sydnor y Sayers, 1954). El tiempo de respuesta de la glándula adrenal es también relativamente breve, a pesar del hecho de que ésta almacena muy poca cantidad de cortisol o corticosterona.

En animales hipofisectomizados o en animales con adrenales transplantadas (Sydnor y Sayers, 1954) el período entre el contacto inicial de ACTH con la corteza adrenal y el incremento en la actividad secretoria es de aproximadamente tres minutos. Similarmente, cuando se agrega ACTH a una suspensión de células

aisladas de corteza adrenal, el incremento en la secreción de corticosterona ocurre luego de un período de 3-5 minutos (Sayers y col, 1973).

EL ACTH no sólo controla la función de una glándula adrenal diferenciada (síntesis de cortocoides y mineralocorticoides), sino que regula también el crecimiento y la replicación de las células corticales. Además de controlar las funciones de la corteza adrenal, el ACTH determina importantes cambios en el metabolismo de las grasas, movilización de ácidos grasos no esterificados y grasas neutras de los depósitos adiposos, aumento de la tasa de oxidación de las grasas, disminución del cociente respiratorio y mejoramiento de la cetogénesis.

b) Relación estructura-actividad.

El estado actual de las investigaciones sobre la relación estructura-actividad puede resumirse de la siguiente manera: el fragmento de la molécula conteniendo los 24 aminoácidos de la porción N-terminal es equipotente con la molécula conteniendo los 39 aminoácidos (Seelig y Sayers, 1973). La secuencia C-terminal a partir del aminoácido 25 no tiene ninguna actividad biológica conocida. Un acortamiento del péptido de ACTH 1-24 a ACTH 1-18 está asociado con una pequeña disminución en la actividad biológica (Hoffman y col, 1970). Cuando uno o más de los aminoácidos dibásicos ubicados en las posiciones 15 a 18 son removidos, se observa una drástica reducción de la actividad biológica (Hoffman y col, 1970). Este grupo de aminoácidos dibásicos es uno de los sitios de afinidad por el receptor más importantes de la molécula de ACTH. Pero a pesar de esta pérdida de afinidad, la inyección de grandes dosis de ACTH 1-10 a ratas hipofisectomizadas o agregado a una suspensión de células de la corteza adrenal, es aún capaz de estimular la esteroidogénesis.

Los aminoácidos en las posiciones 11 a 14 influyen la afinidad pero ninguno es esencial para la activación del receptor, como lo demuestra el hecho de que ACTH 11-24 no tiene actividad intrínseca pero se comporta como un antagonista competitivo de el ACTH 1-24 (Seelig y col, 1971). Estas observaciones indican que el "centro activo" de la molécula de ACTH está en las posiciones 1 a 10. Es interesante la observación de Fujino (Fujino y col, 1972) que el ACTH 6-24 es activo, mientras que el ACTH 7-23 no lo es, por otro lado Schwyzer (Schwyzer y col, 1971) demuestra que el ACTH 5-10 exhibe una débil pero aún significativa actividad esteroideogénica cuando se agrega a células aisladas de la corteza adrenal, sugiriendo que los aminoácidos His6-Phe7-Arg8-Trp9 están involucrados en la activación del receptor.

Por lo tanto, la hormona adenocorticotrópica pertenece a un grupo de hormonas polipeptídicas en la cual un fragmento corto de la cadena activa al receptor, mientras que las otras regiones de la cadena están involucradas en atraer la molécula a su sitio de acción.

c) Caracterización del receptor de ACTH.

El sitio de reconocimiento de el ACTH es la superficie externa de la membrana plasmática de las células de los tejidos blanco, donde interactúa con macromoléculas. Se conocen a partir de los ADNc las secuencias para el receptor de ACTH bovino y humano; estos presentan un 81% de homología. La secuencia incluye siete dominios altamente hidrofóbicos característicos de los receptores hormonales acoplados a proteínas G. Pero a diferencia de la mayoría de estos receptores el extremo N-terminal extracelular y el C-terminal intracelular son cortos y el peso molecular calculado a partir de la secuencia es de 33.000 (Raikhinstein y

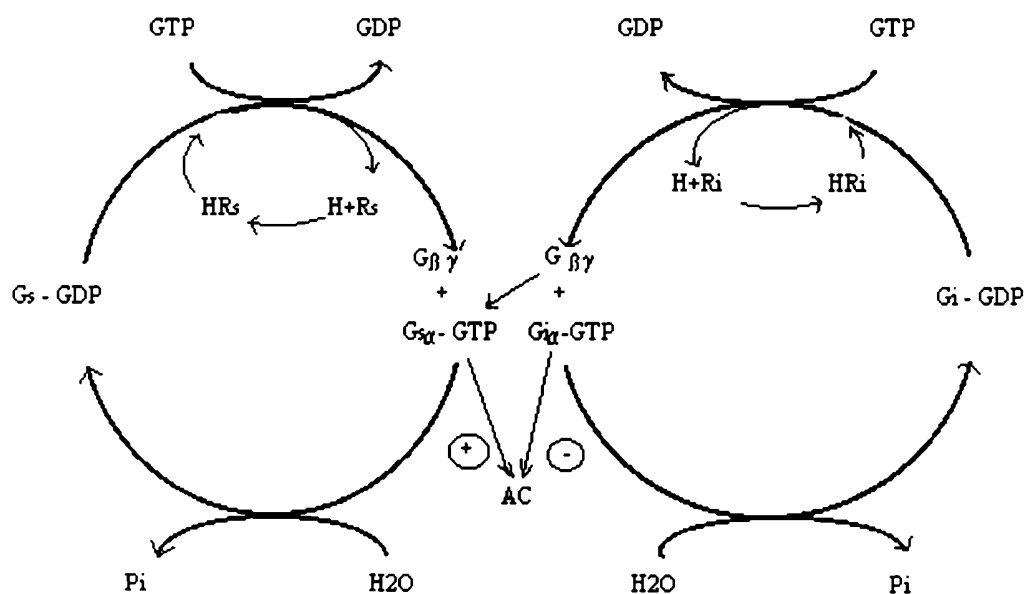
col, 1994). Los estudios utilizando ligandos marcados fotoactivamente reportan masas moleculares (Penhoat y col, 1993) mayores que los 33.000 calculados a partir de la secuencia aminoacídica, pero como tanto la secuencia del receptor humano como del bovino presentan dos puntos posibles de glicosilación; tal vez la diferencia entre los pesos predichos por la secuencia y los datos electroforéticos puedan deberse a la glicosilación del receptor. La secuencia de los dominios intracelulares incluye posibles sitios de fosforilación (Raikhinstein y col, 1994)

d) Sistema de transducción intracelular.

En preparaciones de membrana, la unión de ACTH a su receptor activa la adenilato ciclasa con la subsecuente producción de 3', 5',- adenosina-monofosfato cíclico (AMP_c). Al igual que otros receptores que activan a la adenilato ciclasa, la interacción del receptor de ACTH con esta enzima requiere la acción de una proteína que une nucleótidos de guanina (proteína G). Existen dos tipos de proteínas G ligadas a la adenilato ciclasa, una estimuladora denominada G_s y otra inhibitoria denominada G_i. G_s está relacionada con el receptor estimulador; la unión de un ligando a este receptor provoca un cambio conformacional que se transmite a través de G_s. De esta forma se cataliza el intercambio de GDP por GTP provocando la disociación de la subunidad α_s de la proteína G del dímero $\beta\gamma$ (figura 5). La subunidad α_s activa la adenilato ciclasa. La actividad del complejo α_s -GTP se termina por hidrólisis del GTP a GDP. La misma subunidad α posee actividad de GTPasa.

Se postuló que la proteína G involucrada en el mecanismo de acción de ACTH es de tipo estimulador debido a que la estimulación de la síntesis de AMP cíclico en preparaciones de membrana de células tratadas con ACTH está

FIGURA 5: Mecanismo de activación e inhibición de la adenilato ciclasa mediado por receptor.



Referencias: H: hormona, **Rs**: receptor estimulador, **HR**: complejo hormona-receptor, **Ri**: receptor inhibitorio, **AC**: adenilato ciclasa

aumentada por GTP, por análogos no hidrolizables de GTP y por iones fluoruro (Sáez y col, 1984).

El hecho de que en el mecanismo de acción de ACTH se genere AMPc implica la activación de la quinasa de proteínas dependiente de AMPc, denominada "proteína quinasa A" (PKA). En ausencia de AMPc, esta enzima es un tetrámero inactivo que contiene dos subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas. La unión del AMPc a las subunidades regulatorias altera la afinidad de éstas por la subunidad catalítica y provoca la disociación de la enzima, en un dímero de subunidades regulatorias y dos subunidades catalíticas activas. En presencia de AMPc la subunidad catalítica existe como una proteína monomérica de peso molecular 40,8 kDa. Esta subunidad es la responsable de la mayor parte de las respuestas fisiológicas de las células eucariontes al aumento de AMPc.

Por aproximadamente los 10 años siguientes al descubrimiento del AMPc (Sutherland y Rall, 1958) la mayoría de los datos que se acumularon eran compatibles con un rol esencial del AMPc en la esteroidogénesis estimulada por ACTH, ya que: la hormona aumenta los niveles de AMPc en segmentos de adrenal de rata (Grahame - Smith y col, 1967, Ney y col, 1969); el incremento en la concentración de AMPc precede temporalmente los efectos de ACTH sobre la esteroidogénesis adrenal (Grahame - Smith y col, 1967), este incremento en los niveles de AMPc puede ser asociado con la activación de la adenilato ciclase producida por la hormona en lisados celulares (Grahame - Smith y col, 1967; Tauton y col, 1967, Ney y col, 1969; Hechler y col, 1969) y es producido en el rango entero de concentraciones efectivas para estimular la esteroidogénesis (Grahame - Smith y col, 1967). Por otro lado el AMPc agregado a secciones de adrenal de rata (Haynes y col, 1959; Birmingham y col, 1960; Ferguson, 1963; Karaboyas y Koritz,

1965; Halkerston y col, 1966) estimula la esteroidogénesis mimetizando los efectos de ACTH. Ya sea el ACTH o el AMPc ejercen su acción sobre el mismo paso: la conversión de colesterol a pregnenolona (Karaboyas y Koritz, 1965).

Conceptualmente, sin embargo, la hipótesis de Sutherland dejaba sin resolver ciertos aspectos, ya que no incluía la existencia de otros mediadores en el mecanismo de acción de ACTH que actuaran concomitante o independientemente al AMPc. Por otro lado, las relaciones cuantitativas entre la acción de el ACTH sobre la acumulación de AMPc y la esteroidogénesis demostraron ser más bien complejas. Usando células adrenales de rata, diversos grupos (Beall y Sayers, 1972; Mackie y col, 1972) demostraron que las curvas logarítmicas dosis-respuesta para la esteroidogénesis estimulada por ACTH y para la acumulación de AMPc son paralelas pero no coincidentes. El valor de DE_{50} para la acción de ACTH sobre la acumulación de AMPc es por lo menos de un orden de magnitud mayor que la DE_{50} para la esteroidogénesis estimulada por ACTH. En muchos estudios bajas concentraciones de ACTH, que estimulaban la síntesis de esteroides a niveles menores que la dosis media máxima, no tenían efectos medibles sobre los niveles de AMPc.

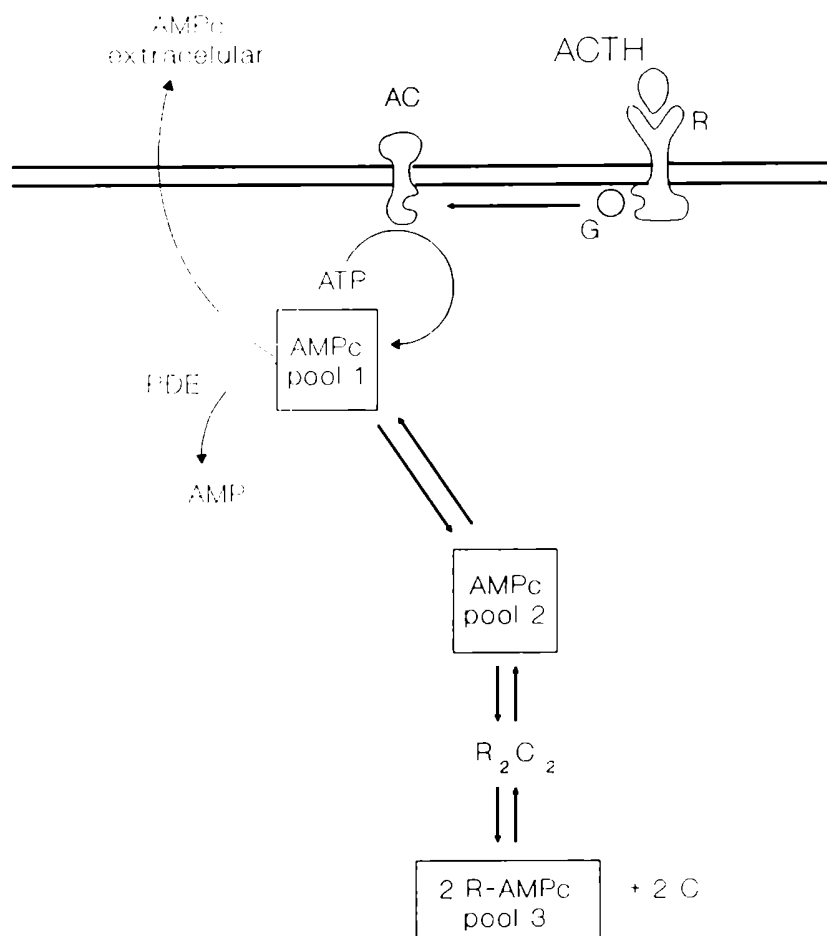
Alternativamente, la mayoría de los resultados eran compatibles con un modelo o hipótesis de reserva de receptores en el cual ACTH actuaba a través de un proceso AMPc dependiente, pero sólo una pequeña fracción del AMPc formado era necesaria para la esteroidogénesis (Mackie y col, 1972; Seelig y Sayers, 1973; Finn y col 1976), sin embargo no existían datos experimentales que demostraran dicha hipótesis .

Para explicar la observaciones de que cambios medibles en la esteroidogénesis luego del tratamiento hormonal ocurrían sin variaciones

detectables en los niveles de AMPc, se argumentó que los cambios en la concentración de AMPc ocurrían en lugares discretos y que eran demasiado pequeños para ser detectados. Algunos investigadores (Podestá y col, 1979a; Sala y col 1979) midieron la cantidad de AMPc unido a receptores citoplasmáticos examinando la posibilidad de que esta fracción representara más exactamente el pool de nucleótido cíclico importante para la esteroidogénesis.

Los estudios de Podestá (Podestá y col, 1979a) demostraron que el AMP_c está altamente compartimentalizado (figura 6). Parte del AMPc formado intracelularmente es transportado activa o pasivamente al espacio extracelular tan pronto como se alcanza una concentración intracelular mínima. El AMPc total intracelular también está compartimentalizado. La mayoría de las moléculas que forman este pool son susceptibles a la degradación por la fosfodiesterasa y una pequeña fracción está en equilibrio con el complejo AMPc - receptor (subunidad reguladora de la proteína quinasa AMPc dependiente). El incremento en el AMPc unido a la subunidad reguladora de la PKA correlaciona muy bien con la estimulación aguda de la esteroidogénesis en células adenocorticales en todo el rango de concentraciones de ACTH, y no es necesaria la ocupación de todos los sitios receptores disponibles para lograr la producción máxima de esteroides. La discrepancia entre la dosis de corticotropina necesaria para inducir la producción de corticosterona y de AMP cíclico, pudo ser resuelta cuando se midió el AMP_c unido a la subunidad reguladora de la proteína quinasa, que constituye una pequeña fracción del AMPc total.

Este modelo explicaría porqué la síntesis de esteroides ocurre en ausencia de un aumento medible en los niveles de AMPc. En

FIGURA 6: Compartimentalización intracelular del AMP_C.

Referencias: El AMP_C intracelular está distribuido en tres compartimentos: Pool 1: AMP_C libre que no está en equilibrio con el pool de proteína quinasa (R₂C₂) y representa más del 90 % del AMP_C total intracelular. Pool 2: AMP_C en equilibrio con su receptor. Pool 3: AMP_C unido a su receptor (R-AMP_C); en este estado permite la liberación de la subunidad catalítica (C) de la proteína quinasa de la subunidad reguladora de la proteína quinasa, que constituye una pequeña fracción del AMP_C total.

el acople funcional no serían necesarias grandes cantidades de AMPc y un pequeño aumento puede ser suficiente para cumplir la función celular.

Estos resultados y los obtenidos trabajando con dos mutantes de una línea de células tumorales de adrenal defectivas en la actividad de la adenilato ciclasa o de la PKA (Rae y col, 1979), ofrecieron una evidencia directa para el rol intermediario del AMPc y la proteína quinasa durante la estimulación de la esteroidogénesis con bajas dosis hormonales. Garren y Gill (Garren y Gill , 1970) demostraron la presencia de una quinasa de proteínas dependiente del AMPc en la fracción citosólica de la adrenal bovina. La cromatografía del citosol en columnas DEAE - celulosa resolvió la enzima de adrenal bovina en dos fracciones que eluían como las isoenzimas tipo I y II . En las glándulas de adrenal de rata se encontró solamente la enzima tipo I (Shima y col, 1974; Sharma y col, 1977).

El ACTH incrementa la actividad de la PKA en una manera dosis dependiente en células aisladas de adrenal de rata (Richardson y Schulster, 1973; Sharma y col, 1974; Perchelet y Sharma 1977) y la activación de la quinasa precede temporalmente a la esteroidogénesis (Richardson y Sculster, 1973; Sharma y col, 1974).

Por lo tanto, el AMPc se une a la subunidad reguladora de la PKA produciendo su activación e iniciando la fosforilación de proteínas que regularían los eventos tempranos de la esteroidogénesis.

A diferencia de otras hormonas que actúan sobre la corteza adrenal, tales como angiotensina II y acetilcolina, ACTH no ejerce su acción vía la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5 difosfato y generación de diacilglicerol e inositol trifosfato (Iida y col, 1986).

e) Regulación del paso limitante de la esteroidogénesis, conversión de colesterol en pregnenolona.

A pesar de que es claro el rol del sistema AMPc - PKA en la estimulación por ACTH de la síntesis de esteroides, no se ha elucidado aún cómo la fosforilación dependiente de AMPc puede transmitir una señal específica a su sitio de acción en la mitocondria, donde se hallan alojadas las enzimas involucradas en la conversión de colesterol a pregnenolona. Esta reacción, es decir el clivaje de la cadena lateral del colesterol, es común a todos los sistemas esteroidogénicos incluyendo aquellos que ocurren en la glándula adrenal. Aparentemente, la naturaleza limitante de este paso no resulta de una limitación en la actividad del Cit P450_{scc}, sino que está limitado por la transferencia de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Hall y col, 1979; Crivello y Jefcoate, 1980; Hornsby, 1988).

En la glándula adrenal en condiciones basales, la principal fuente de colesterol son las lipoproteínas plasmáticas (Borkowsky y col, 1967) y cantidades menores de colesterol provienen de la síntesis *de novo* a partir de acetato dentro de las células adrenocorticales o a partir de depósitos dentro de las gotas lipídicas; en éstas el colesterol se encuentra principalmente como ésteres que deben ser hidrolizados a colesterol libre antes de entrar en la biosíntesis de esteroides. Algunas acciones de el ACTH, que no parecen ser el paso limitante para la inmediata conversión de colesterol en P₅, mantienen el depósito precursor de colesterol y una velocidad constante para la entrega de éste a la mitocondria.

El colesterol es liberado de los depósitos intracelulares de ésteres de colesterol luego de la activación mediada por fosforilación dependiente de AMPc de la colesterol-ester hidrolasa (Boyd y Trzeciak; 1973, Beckett y Boyd, 1977). Se cree que el colesterol libre es luego transportado hacia un depósito donde está

disponible para ser metabolizado por la reacción de clivaje de la cadena lateral para formar pregnenolona. Así, se cree que el colesterol localizado en la membrana interna de la mitocondria constituiría el sustrato rápidamente metabolizable, y que la regulación hormonal de la esteroidogénesis involucraría el movimiento de colesterol desde otros sitios en la célula hacia el depósito de la membrana interna (Seybert y col, 1979).

Se ha postulado que las hormonas tróficas actúan en los tejidos esteroidogénicos estimulando la transferencia de colesterol desde la membrana mitocondrial externa a la interna requiriendo de la acción de una proteína sensible a la cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas. Esta proteína fue designada "factor lábil proteico" debido a que la adición de cicloheximida luego de ACTH, provoca que la velocidad de producción de esteroides retorne a niveles basales con un $t_{1/2}$ de 5-15 minutos luego del agregado de cicloheximida.

Por otro lado, si la actividad del Cit P450 es bloqueada con aminoglutetimida (AG), un inhibidor del Cit P450_{scc}, en respuesta a la hormona se acumula colesterol en la membrana mitocondrial interna pero no existe síntesis de esteroides. La remoción de AG resulta en un rápido y sustancial aumento en la producción de esteroides (Crivello y Jefcoate, 1980). Si se administra cicloheximida conjuntamente con AG, la transferencia de colesterol a la membrana interna se inhibe y el depósito rápidamente metabolizable se pierde (Privalle y col, 1983).

Estos hechos conjuntamente con la evidencia de que los niveles de las enzimas que catalizan la reacción de clivaje permanecen constantes durante la fase aguda de la respuesta estimuladora (Koritz y Kumar, 1979) hizo que se propusiera a la proteína lábil como un paso clave en la regulación de la síntesis de esteroides.

En los últimos 20 años se ha realizado gran cantidad de trabajo para la caracterización molecular y funcional del factor proteico lábil y del sustrato endógeno de la PKA.

Trabajando con células adrenocorticales enteras, Podestá y col (Podestá y col, 1979b) demostraron que ACTH y AMPc inducen, con las mismas dosis y el mismo tiempo en que promueven la esteroidogénesis, un rápido y transitorio incremento en la fosforilación de una proteína citoplasmática de aproximadamente 150.000 Daltons (APS 150). La síntesis de esta proteína es inhibible por cicloheximida con un $t_{1/2}$ de 10 minutos.

Deviller y col, (Deviller y col, 1987) han descripto una correlación entre la desfosforilación de una proteína citoplasmática de peso molecular 20 kDa y la activación de la esteroidogénesis. Los autores describen que esta proteína es también desfosforilada por All, AMPc y ésteres de forbol.

También se ha propuesto como proteína intermediaria, a una proteína de 13,2 kDa denominada SCP2, proteína transportadora de esteroides . La SCP2 se sintetiza como una proteína de 15,3 kDa con una secuencia N-terminal de 20 aminoácidos que es subsecuentemente removida (Billheimer y col, 1990; Yamamoto y col, 1991). Este péptido tiene muchas características que lo hacen similar a aquellas secuencias que dirigen hacia la mitocondria (Pfeifer y col, 1993). Esta proteína esta también presente en células de Leydig (Van Noort y col, 1988).

La SCP2 aumenta el movimiento de colesterol entre vesículas e incrementa la formación de pregnenolona cuando se agrega a mitocondrias adrenocorticales (Vahouny y col, 1983). Más aún, anticuerpos dirigidos contra SCP2 neutralizan actividades que incrementan la síntesis mitocondrial de pregnenolona en citosol de

tejidos esteroideogénicos (Pfeifer y col, 1993) y la sobreexpresión de SCP2 en células COS aumenta la esteroideogénesis (Yamamoto y col, 1991).

Sin embargo, SCP2 no es agudamente regulada por acción hormonal, y la proteína aún se encuentra en la célula luego del tratamiento con cicloheximida (Pfeifer y col, 1993).

Pedersen y sus colegas aislaron (Pedersen y Brownie, 1983) y secuenciaron (Pedersen y Brownie, 1987) un polipéptido de 3.2 kDa (30 residuos), denominado polipéptido activador de la esteroideogénesis (SAP), que estimula la actividad de la enzima de clivaje en la mitocondria adrenal de ratas tratadas con cicloheximida (Pedersen y Brownie, 1983; Mertz y Pedersen, 1989). La estructura del SAP es casi idéntica a los 29 aminoácidos C-terminales de una "heat shock protein" de 78 kDa aislada de rata, la proteína 78 regulada por glucosa (GRP78). El SAP está presente en todos los tejidos esteroideogénicos que se han investigado, y su incremento por estímulo hormonal o AMPc precede a la respuesta esteroideogénica (Mertz y Pedersen, 1989).

Los niveles de SAP disminuyen en presencia de cicloheximida con una vida media no mayor que 5-7 min., dentro del rango propuesto para el hipotético factor lábil implicado en el control de la esteroideogénesis. Se ha sugerido que el SAP se produce por una proteólisis co-transduccional, estimulada por la PKA, de la GRP78 cuando ésta es transferida desde el ribosoma al lumen del retículo endoplasmático (Mertz y Pedersen, 1989). El SAP es capaz de estimular la transferencia intramitocondrial de colesterol, pero sus efectos no alcanzan los niveles de producción de P_5 que produce la activación hormonal.

También se ha demostrado la existencia de una fosfoproteína mitocondrial pp30 en la glándula adrenal (Pon y col, 1986; Alberta y col, 1989) y en cuerpo lúteo

(Pon y col, 1988). Se observó que pp30 se acumula en el mismo tiempo, y dosis de estimulante (hormona peptídica o AMPc) que el incremento en la esteroidogénesis. La inhibición de la síntesis proteica, inhibe la producción de pp30; ésto ha llevado a que se propusiera que pp30 o un precursor de mayor tamaño se codifica en el núcleo, se sintetiza en los ribosomas citoplasmáticos y se importa a la mitocondria. Además, p30 la forma desfosforilada de pp30, se acumula en las células sin estimular y también está localizada en las mitocondrias. A pesar de que las proteínas p30 (pI=6.9) y pp30 (pI=6.5) parecen ser estructuralmente similares, se demostró que p30 no se convierte a pp30 por modificación post-transduccional; sino que es posible que p30 se convierta a pp30 durante la síntesis proteica, esto es co-transduccionalmente (Pon y col, 1986). Más recientemente se han aislado dos proteínas pp37 y pp32 (Epstein y Orme-Johnson, 1991) precursoras de pp30. Las fosfoproteínas pp37 y pp32 están localizadas en la mitocondria y se producen en respuesta al estímulo hormonal, y presentan mapas proteolíticos similares al de pp30. Resultados similares se han reportado en una línea tumoral de células de Leydig de ratón (Stocco y Sodeman, 1991)

La proteína pp30, denominada StAR: proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, ha sido purificada y clonada (Clark y col, 1994). El ADNc aislado codifica para una proteína novel de 31,6 kDa, la cual es idéntica a la proteína precursora de 37 kDa. La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de esta proteína es característica de los péptidos que dirigen hacia la mitocondria. La inducción de esta proteína en células MA10 puede activar la producción de esteroides sin estimulación hormonal, aunque la diferencia en la producción de P_4 entre las células estimuladas y las transfectadas es por lo menos de tres órdenes.

Recientemente se ha probado en tres individuos no relacionados con hiperplasia lipoide adrenal congénita (una enfermedad recesiva autosómica caracterizada por defecto en la síntesis de todos los esteroides adrenales y gonadales), que StAR estaba mutada y no era funcional. Estos estudios proveyeron evidencia genética a favor de que la StAR es indispensable en la esteroidogénesis en gónadas y adrenal (Lin y col, 1995).

Otro intermediario propuesto es el receptor periférico para benzodiazepinas situado en la membrana externa mitocondrial (MDR) de las células adrenales, de Leydig y de la glía, puede jugar un rol en la transferencia de colesterol a la membrana interna mitocondrial (Papadopoulos y col, 1991).

Más recientemente, se ha implicado al inhibidor de la unión del diazepam (DBI) a su receptor en la acción esteroidogénica de ACTH y LH. El DBI es un polipéptido que colocaliza en las células de la glía, adrenocorticales y de Leydig con el receptor mitocondrial para DBI (Cavallaro y col, 1992). En estas células, DBI y alguno de los productos obtenidos luego de su procesamiento se unen al MDR y estimulan la formación de P_5 debido a que facilitan el acceso del colesterol a la membrana mitocondrial interna (Cavallaro y col, 1993). Estos autores también demuestran que ACTH estimula el procesamiento del DBI en la glándula adrenal y sugieren que el bloqueo de la esteroidogénesis producido por acción de cicloheximida podría ser debido a una inhibición en el procesamiento específico del DBI regulado por ACTH (Cavallaro y col, 1992). Además, en células Y_1 y MA10 la esteroidogénesis es inhibida al 50% por flunitrazepan, una benzodiazepina que se une al MDR con gran afinidad (Papadopoulos y col, 1991).

Si bien se ha demostrado que ni el recambio ni la velocidad de síntesis del DBI son modificados por el tratamiento hormonal y que la vida media del péptido es

superior a las 3 horas (Brown y col, 1992), lo cual sugeriría que el DBI no es la proteína lábil, también se ha descrito que en células MA10 a los 10 segundos del tratamiento hormonal se induce la aparición de un sitio de mayor afinidad para la unión de benzodiazepinas en el MDR, lo cual ocurre concomitantemente con el aumento en la síntesis de esteroides (Boujrad y col , 1994).

A pesar que la aparición de todas estas proteínas correlaciona con la activación de la esteroidogénesis, la magnitud de la mayoría de los efectos que ellas promueven es relativamente pequeña, y en algunos casos difícil de reproducir.

f) Rol del calcio.

Aunque el modo primario de acción de ACTH es a través del AMPc y la PKA, el calcio probablemente juegue un rol secundario aumentando y modulando la acción de ACTH a través de la vía de la PKA. La importancia de la acción del Ca^{++} como mensajero intracelular para ACTH puede variar según la zona de origen de la célula y de la especie en cuestión. Sin embargo, es claro que la vía Ca^{++} /calmodulina puede ser activada por ACTH (Hornsby y col, 1988).

Se ha comprobado que el calcio es necesario para la unión de ACTH a su receptor (Ramachandran, 1984) y en algún paso posterior a la activación de la adenilato ciclasa (Podestá y col, 1980). El ACTH, al igual que otras hormonas esteroidogénicas incrementa el influjo de Ca^{++} en las células blanco, probablemente por una acción sobre los canales de Ca^{++} sensibles al voltaje (Kojima y col, 1985b). Pese al hecho de que tanto la zona glomerulosa como la zona fasciculata poseen canales de Ca^{++} dependientes de voltaje (Quinn y col, 1987), la zona glomerulosa posee una mayor concentración de estos canales en la membrana plasmática (Aguilera y Catt, 1986). Los estímulos que solo aumentan el nivel de AMPc, tales

como la forskolina, no incrementan el influjo de Ca^{++} , lo cual hace suponer que de alguna manera el receptor para ACTH está acoplado al canal de Ca^{++} mediante una proteína G u otro mecanismo (por ejemplo inactivación del canal de potasio), (Payet y col, 1987). Otros estímulos esteroideogénicos de las células de la zona glomerulosa, All y potasio, actúan activando el influjo de Ca^{++} como parte de su acción esteroideogénica (Kojima y col, 1985b). Tal vez, el ACTH actúa de manera análoga, pero sólo en algunas especies (Hornsby, 1988). Es controvertido hasta el momento en qué medida el calcio juega un rol en la acción de ACTH en la zona fasciculata - reticularis.

El calcio, a través de la proteína quinasa dependiente de calmodulina, puede activar y sinergizar con elementos de la respuesta esteroideogénica activados por AMPc. Las interacciones entre la PKA estimulable por ACTH y otros sistemas de mensajeros estimulados por otros agentes, dependen de la zona de la corteza adrenal de la cual es originaria la célula. El potencial para interacciones múltiples de otros sistemas con ACTH /PKA, a diferentes niveles desde el receptor/proteína G hasta el punto final de la regulación de la esteroideogénesis, es también mayor en la zona glomerulosa que en la fasciculata.

Los activadores de la proteína G_i inhiben la adenilato ciclasa. La zona glomerulosa tiene altos niveles de receptores que activan proteínas G_i , tales como los de angiotensina y somatostatina (Aguilera y col, 1982), los cuales pueden inhibir la adenilato ciclasa estimulable por ACTH (Hornsby, 1988). Alternativamente, la activación de la quinasa de proteínas C (PKC) y la fosforilación de un sustrato desconocido podría incrementar la estimulación por ACTH de la adenilato ciclasa, como se ha observado en células adrenocorticales bovinas por efecto de la All (Hornsby, 1988).

Recientemente se ha reportado evidencia de que en células de zona fasciculata adrenal un incremento en las concentraciones citosólicas de Ca^{++} puede incrementar la formación de pregnenolona (Capponi y col, 1988). La formación de pregnenolona estimulada por calcio es inhibible por cicloheximida, lo cual sería consistente con que el calcio incrementa la transferencia de colesterol desde la membrana externa mitocondrial al depósito de colesterol esteroidogénico localizado en la membrana interna mitocondrial (Python y col, 1995).

Además de las acciones a corto plazo sobre la síntesis de esteroides, el ACTH mantiene la capacidad esteroidogénica de la célula adrenal por los efectos a largo plazo sobre la síntesis de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis. Todos los Cit P450 son, en distinto grado, inducibles por ACTH actuando a través de la vía del AMPc. Por otro lado, la síntesis de las proteínas accesorias involucradas en la transferencia de electrones, adrenodoxina, adrenodoxina reductasa y Cit P450 reductasa, son también reguladas por ACTH actuando a través de AMPc.

III-2: Hormona Luteinizante.

a) Generalidades.

La hormona luteinizante es una glicoproteína secretada por la hipófisis anterior de los mamíferos en respuesta a la hormona liberadora de LH, secretada por el hipotálamo.

Su sitio de acción en el macho se localiza en el testículo a nivel de las células de Leydig, donde estimula la producción de testosterona. En las hembras, la

LH interactúa con las células de la teca y de la granulosa donde conjuntamente con la FSH, controla la diferenciación de los folículos, la ovulación y la esteroidogénesis.

El mecanismo de acción de LH tanto en el testículo como en el ovario presenta muchas similitudes con lo referido para ACTH en la corteza adrenal.

b) Caracterización del receptor de LH/hCG.

Los efectos de LH se inician con la unión de la hormona circulante a receptores de alta afinidad ubicados en la membrana celular (Catt y col, 1972). La purificación inicial de los receptores de LH de ovario de rata, resultó en la caracterización de una cadena polipeptídica de 90 kDa (Podestá y col, 1986; Keinanen y col, 1987, Ascoli y Segaloff, 1989). La obtención del ADNc para el receptor de LH demostró que el receptor estaba formado por una única cadena de 674 aminoácidos y predijo una masa molecular de 75 kDa (Segaloff y Ascoli, 1993).

La estructura del receptor de LH es similar a la de otros receptores acoplados a proteína G, conteniendo siete dominios transmembrana, una región citoplasmática rica en serina / treonina la cual contiene un posible sitio de fosforilación (Sáez, 1994). Aproximadamente la mitad de los aminoácidos están presentes en un dominio citosólico extracelular, que contiene seis potenciales sitios de glicosilación. A pesar de que es sabido que el receptor es una glicoproteína (Minegishi y col, 1989; Petaja-Repo y col, 1991) no se sabe en la actualidad cuántos de los seis sitios contienen carbohidratos. Es posiblemente la naturaleza glicoproteica del receptor la responsable de la diferencia entre la masa molecular predicha a partir del ADNc y la masa aparente deducida de los estudios de geles de poliacrilamida del receptor purificado.

Luego de la unión de un agonista, se produce un cambio conformacional en el receptor de LH, lo cual se ha demostrado que favorece su fosforilación durante la fase inicial de la respuesta. Una prolongada exposición al agonista reduce la fosforilación (Minegishi y col, 1989), lo cual puede actuar como un mecanismo de regulación negativa del receptor. Esta fosforilación del receptor está catalizada por la PKA.

El receptor de LH se encuentra acoplado a efectores intracelulares, principalmente a la adenilato ciclasa (Dufau y col, 1980). El mecanismo molecular involucrado en dicho acople no se conoce. Se ha postulado que la agregación del receptor juega un rol crítico en este proceso (Podestá y col, 1986). Estos estudios sugieren que el proceso de unión de la hormona al receptor en sí mismo, es un evento biológicamente improductivo sin un paso subsecuente de dimerización, microdistribución o agregación (Podestá y col, 1983 y 1986). El mecanismo por el cual la unión de la hormona desencadena estos procesos es aún desconocido.

c) Sistema de transducción intracelular.

Los pasos siguientes a la activación del receptor involucran la acción de la adenilato ciclasa. Esta estimulación ocurre a los pocos minutos de agregada la hormona, es dosis dependiente y también puede ser demostrada en membranas aisladas. Los efectos estimulatorios de LH sobre la adenilato ciclasa son mediados por la proteína G estimuladora.

Al igual que lo descripto para ACTH, la activación de la adenilato ciclasa resulta en la hidrólisis de ATP para dar AMPc, con la subsecuente estimulación de los eventos dependientes de AMPc. La activación de la PKA (Roemmerts y col, 1974; Cooke y col, 1976; Podestá y col, 1976 a y b; 1978 a y b) lleva a la

fosforilación de proteínas específicas, las cuales participan en la regulación del paso limitante de la síntesis de esteroides similarmente a lo referido para la acción de el ACTH en la glándula adrenal. Estudios realizados en células de Leydig con distintos análogos del AMPc, han demostrado que tanto la PKA tipo I o II están presentes (Moger, 1991). Sin embargo la PKA tipo I se encontraría compartimentalizada en las células de Leydig, teniendo así acceso preferencial al AMPc producido endógenamente. En concordancia con estos estudios se ha descripto (Podestá y col, 1991), que la estimulación del receptor de LH, el cual está acoplado a la adenilato ciclasa, lleva a una respuesta interna la cual permanece circunscripta al sitio de estimulación. Así, el complejo hormona-receptor no transmitiría una señal intramembrana o intracelular para activar receptores no ocupados.

El Ca^{++} extracelular es requerido para obtener la respuesta máxima en células de Leydig estimuladas con LH (Sullivan y Cooke, 1986). Estudios realizados utilizando el indicador intracelular fluorescente Quin 2 han demostrado que LH incrementa el Ca^{++} intracelular y que este incremento es dependiente principalmente de los niveles de Ca^{++} extracelular. Los análogos del AMPc son igualmente efectivos para incrementar los niveles de Ca^{++} intracelular, indicando que el AMPc es uno de los mediadores de la acción de LH sobre la movilización de Ca^{++} (Sullivan y Cooke, 1986).

Se ha demostrado que LH estimula la formación de inosítoles fosfato, incluyendo al 1,4,5-inositol trifosfato (IP_3) en células de ovario (Lowitt y col, 1982), el cual colaboraría en el incremento en el Ca^{++} intracelular inducido por LH. Sin embargo, el AMPc sería más importante en la regulación del Ca^{++} intracelular especialmente en las células de Leydig (Sullivan y Cooke, 1986).

Otra consecuencia de la activación del recambio del fosfatidilinositoles es la liberación de diacilglicerol (DG). Hasta el momento no existen reportes de estimulación directa del DG y/o activación de la PKC inducidos por LH en las células de Leydig (Leung y Steele, 1992). Sin embargo, los resultados obtenidos utilizando ésteres de forbol indica que la PKC está involucrada en el mecanismo de acción de LH. Los ésteres de forbol mimetizarían la desensibilización inducida por LH de la adenilato ciclasa (Cooke y col, 1987).

Más recientemente se ha descripto (Wang y Ascoli, 1990), trabajando con cultivos de una línea tumoral de células de Leydig de ratón (MA10) y a partir de células MA10 que expresan una forma mutada de la subunidad reguladora de la PKA tipo I, que el AMPc es el único mediador en la activación por LH de la síntesis de esteroides. En un estudio previo estos autores (Ascoli y col, 1989) también describen que: LH no activa la fosfolipasa C (PLC) ; la activación de la PLC por otros ligandos (arginina, vasopresina) no resulta en un incremento en la síntesis de esteroides; y que la remoción del Ca^{++} extracelular no afecta la respuesta esteroideogénica a LH.

III-3: Angiotensina II.

a) Generalidades.

La AII es un octapéptido producto de las acciones sucesivas de la renina y de la enzima convertidora de angiotensina. En algunas especies, la AII es convertida al heptapéptido angiotensina III (AIII), estimulante igualmente potente en la producción de aldosterona. La AII y la AIII son inactivadas con rapidez por las angiotensinasas.

La All es un regulador clave de la homeostasis cardiovascular y ejerce en sus diversos tejidos blanco diferentes funciones tales como: controlar el tono muscular, estimular el crecimiento de tejidos, la actividad neuronal y es el principal regulador de la secreción de aldosterona en células de glomerulosa adrenal. La All regula la síntesis de aldosterona en dos niveles de su ruta biosintética (fig. 2). El primer sitio de regulación es la conversión de colesterol en P_5 . Este paso es también estimulado por ACTH y potasio y se ha denominado paso temprano (Campbell y col, 1986). El segundo sitio de regulación llamado paso tardío, es la conversión de corticosterona en aldosterona. Esta reacción es estimulada por potasio y por altas dosis de All (Campbell y col, 1986).

b) Caracterización del receptor.

La acción estimuladora de All es iniciada a través de la unión específica a un receptor de alta afinidad ubicado en la membrana plasmática (Goodfriend y Peach, 1975) de las células de zona glomerulosa. Receptores para All también han sido identificados en riñón, cerebro, útero, placenta y células hepáticas (Mendelsohn, 1985). Múltiples líneas de evidencia sugerían la existencia de distintos subtipos de receptores para All para sus diversas acciones, pero solo recientemente se han definido dos subtipos distintos de receptores basándose en sus propiedades farmacológicas y bioquímicas. Estos subtipos han sido designados como receptores tipo 1 (AT_1) y tipo 2 (AT_2) (Whitebread y col, 1989). Los receptores AT_1 predominan en la corteza adrenal, el hígado, músculo liso vascular, células mesangiales, y en útero y cerebro de rata; mientras que los receptores AT_2 están presentes en adultos en médula adrenal y en feocromocitoma de rata, útero humano y en cerebro (Sumners y col, 1991) aunque son abundantes y ampliamente distribuidos en los

tejidos fetales y en cerebro inmaduro (Mukuyama y col, 1993). Hasta el momento los extensivos estudios farmacológicos indican que la mayoría de los efectos conocidos de la AI en adultos son atribuibles a los receptores AT_2 a través de su capacidad de estimular el recambio del fosfatidilinositol o de inhibir la adenilato ciclasa. El gen para el receptor AT_1 ha sido clonado a partir de corteza adrenal bovina (Sasaki y col, 1991). Este receptor contiene 359 aminoácidos e incluye siete potenciales dominios transmembrana; la región extracelular contiene tres sitios de glicosilación, mientras que en la intracelular existen varios potenciales sitios de fosforilación en tirosina o serina/treonina. Más recientemente se ha mostrado que en la corteza adrenal, entre otros tejidos, el receptor AT_1 puede ser subdividido en AT_{1A} y AT_{1B} (Elton y col, 1992). Estos dos subtipos presentan gran homología de aminoácidos (95%) pero sus genes son muy diferentes debido a variaciones en las regiones 5' y 3' no traducidas, un hecho que sugiere diferente expresión de los genes. La glándula adrenal expresa principalmente ARNm para AT_{1B} (Capponi y col, 1994).

Los receptores AT_2 no parecen estar involucrados en la generación de señales intracelulares clásicas, ni tampoco se ha mostrado que estén ligados a ninguna de las proteínas G conocidas (Mukuyama y col, 1993). Este tipo de receptor también ha sido recientemente clonado a partir de una línea celular de feocromocitoma de rata (Capponi y col, 1994).

d) Generación de mensajeros intracelulares.

La observación de que el AMPc no estaba aumentado aún a las mayores dosis de AI requeridas para la estimulación de la esteroidogénesis (Bell y col, 1981), sentó las bases para la existencia de un mecanismo independiente de AMPc

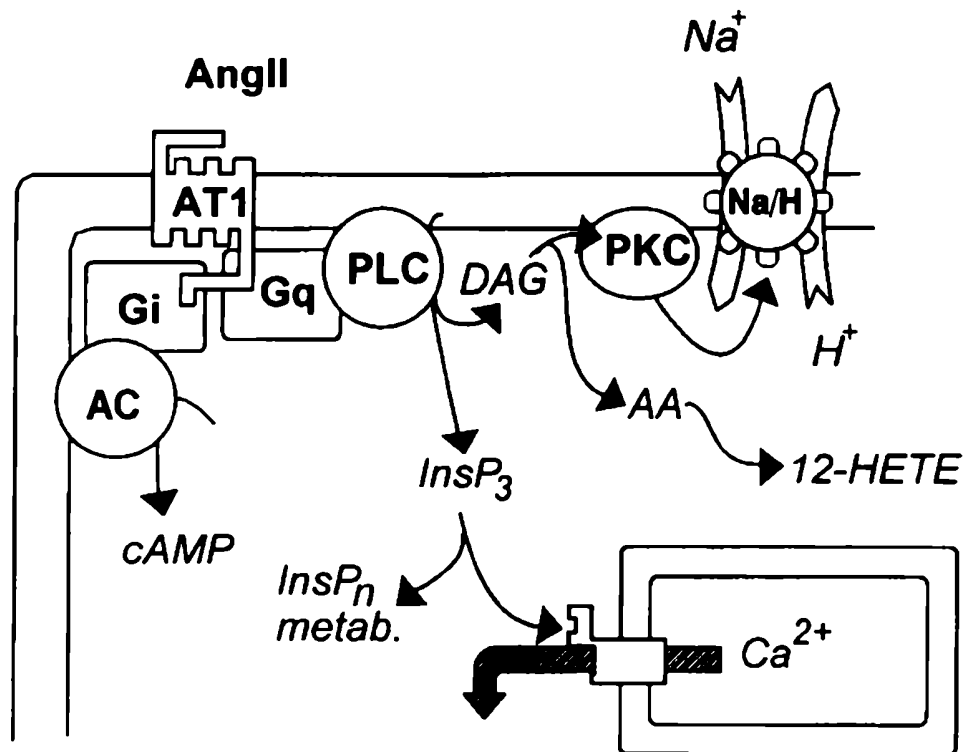
para este péptido. La interacción de AII con su receptor de membrana en una variedad de tejidos blanco está asociado con la movilización de calcio y el recambio de fosfolípidos (Quinn y Williams, 1988). La reacción inicial implica la activación de una PLC específica para fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP_2) generando por lo menos dos segundos mensajeros (fig. 7): el primero, inositol 1,4,5 trifosfato, induce la movilización de calcio citosólico (Kojima y col, 1984a). El otro mensajero generado por la acción de la PLC es diacilglicerol, el cual en conjunto con los niveles aumentados de Ca^{++} citosólico estimula la PKC, la proteína quinasa dependiente de fosfolípidos, sensible al calcio y activable por DG; además el DG sirve como fuente de ácido araquidónico (AA, fig. 7).

El hecho de que los análogos no hidrolizables de GTP puedan activar el clivaje del PIP_2 sugeriría un rol funcional para las proteínas G en el mecanismo de transducción de AII (Hausdorff y col, 1987; Rasmussen y col, 1987; Fain y col, 1988).

En la ZG adrenal la respuesta esteroidogénica está mediada por dos proteínas G: a bajas concentraciones de hormona se activa una proteína G insensible a toxina pertussis (G_q) que lleva a la síntesis de aldosterona presumiblemente a través de la activación de la PLC (fig. 7, Hausdorff y col, 1987). A concentraciones supramáximas de la hormona se activa otra proteína G sensible a la toxina pertussis cuyo rol sería mediar la atenuación de la respuesta esteroidogénica (Hausdorff y col, 1987) e inhibir el efecto de AII sobre el influjo de calcio (Kojima y col, 1986).

También se ha descrito (Hausdorff y col, 1987) que AII produce una inhibición de la adenilato ciclasa, lo que también involucra la acción de una proteína

FIGURA 7: Generación de mensajeros intracelulares por AngII.



Referencias: G: Proteína G, AC: Adenilato ciclasa, **InsP₃**: inositol 1,4,5, trifosfato, DAG: diacilglicerol (Fuente: Capponi y col, 1994)

G_i. Aún no se ha determinado si esta proteína es distinta de aquella que afecta el influjo de calcio.

La activación de la PLC ocurre rápidamente como se pone en evidencia por la reducción en los niveles de fosfatidilinositol 4,5 difosfato marcado con ³H inositol y la aparición de inositol 1,4,5 trifosfato radiactivo dentro de los 5 segundos (Farese y col, 1984) de la aplicación de AII. Luego de un minuto, el nivel de PIP₂ ha disminuido aproximadamente un 40% con respecto a los controles (Enyedi y col, 1985). A pesar de la hidrólisis continua de PIP₂, cuando se somete al tejido a una estimulación hormonal continuada, los niveles de PIP₂ no se mantienen reducidos.

La naturaleza transitoria en la caída del contenido de PIP₂ contrasta con la reducción sostenida en el contenido de fosfatidilinositol (PI) observada luego de una exposición continua a un agonista (Griendling y col, 1986). Esta pérdida sostenida de PI se ha interpretado como el resultado de una fosforilación de PI a fosfatidilinositol monofosfato (PIP) y luego a PIP₂ que será hidrolizado por la PLC (Berridge, 1983). También se ha postulado que en la estimulación sostenida con AII, PIP₂ es el sustrato preferido inicialmente pero a tiempos mayores tanto PI como PIP pueden ser hidrolizados (Griendling y col, 1986).

Una vez formado el Ins (1,4,5,)P₃ es metabolizado a diversos productos. La aparición de Ins(1,3,4,)P₃ a tiempos cortos luego del agregado de la hormona sugiere que ambas isoformas están metabólicamente relacionadas y que el Ins(1,4,5) no es únicamente atacado por fosfatasa. La presencia de formas más fosforiladas sensibles a la hormona, no solamente el Ins (1,3,4,5)P₄ sino también otras dos formas de inositol tetrakisfosfato y aún un inositol pentakisfosfato revelan la complejidad del metabolismo del inositol fosfato y el rol clave que juegan algunas quinasas y fosfatasa en regular el nivel de estos metabolitos.

El IP_3 producido por acción de la PLC acopla la activación del receptor a la movilización de Ca^{++} a partir de un depósito intracelular, probablemente componente del retículo endoplasmático (RE) (Berridge, 1983) y ejerce su acción luego de unirse a un receptor específico. La evidencia para un rol del Ca^{++} en la regulación de la esteroidogénesis por All se basa en la dependencia de esta última por el Ca^{++} extracelular y los efectos inhibitorios de los antagonistas de calmodulina y los bloqueantes para los canales de Ca^{++} dependientes de voltaje (Nakano y col, 1990).

d) Rol del calcio.

La adición de All a los tejidos blanco lleva a tres cambios en el metabolismo del Ca^{++} celular:

- 1) un aumento transitorio en el Ca^{++} citosólico.
- 2) una reducción en el Ca^{++} total celular.

3) un incremento sostenido en la velocidad de entrada de Ca^{++} a través de la membrana plasmática.

El agregado de All induce una elevación inmediata en el Ca^{++} citosólico desde una concentración de aproximadamente 80-120 nM a 600-1600 nM, seguido por una aguda declinación que se mantiene todo a lo largo de la fase sostenida (Barrett y col, 1988). Los experimentos realizados para determinar la fuente de Ca^{++} demostraron que el Ca^{++} que entra al citosol a partir de un compartimento intracelular determina la magnitud de la fase temprana de la respuesta transitoria de Ca^{++} , pero que la última fase de este período está también afectada por el influjo de Ca^{++} extracelular a la célula (Barrett y col, 1988). El Ca^{++} que entra al citosol en la

fase temprana de la respuesta celular proviene principalmente de un componente del RE (Kojima y col, 1984a; Joseph y col, 1984; Somlyo y col, 1985).

Una vez movilizado, una gran proporción del Ca^{++} citosólico es expulsado de la célula a través de la membrana plasmática. Este incremento en el eflujo de Ca^{++} es transiente, comenzando 4 ó 5 minutos luego del agregado de AII y es observado en ausencia de Ca^{++} extracelular (Foster y Rassmussen, 1983). En condiciones de Ca^{++} cero el tratamiento de las células adrenales con dantroleno, un bloqueante de los canales de Ca^{++} , anula totalmente el eflujo de Ca^{++} inducido por AII (Kojima y col 1985a), confirmando que el Ca^{++} perdido por la célula es movilizado a partir de un componente del RE. Esto resulta en una pérdida neta del Ca^{++} total celular luego de la estimulación con AII (Kojima y col 1985 c y d).

El Ca^{++} total celular permanece bajo a lo largo de toda la fase sostenida de la respuesta a AII, sugiriendo que las pequeñas cantidades de IP_3 formadas inhiben el relleno del RE (Barrett y col, 1988).

Por otro lado AII induce un incremento sostenido en la velocidad de entrada de Ca^{++} a través de la membrana plasmática en células de glomerulosa adrenal (Kojima y col, 1985b) y en hepatocitos; esto, sumado al hecho que los niveles de Ca^{++} permanecen bajos en presencia de AII, implica que el incremento sostenido en el influjo debe ser compensado por un incremento en el eflujo estableciendo una alta velocidad de reciclado de Ca^{++} a través de la membrana plasmática.

Al comienzo de la respuesta el aumento en el Ca^{++} citosólico producido como consecuencia de la generación de IP_3 activa proteínas quinasas dependientes de calmodulina cuya actividad produce el estado de fosforilación que se observa en células adrenales, hepáticas y tejido muscular liso (Barrett y col, 1988). Como consecuencia del eflujo de Ca^{++} el aumento en el calcio citosólico es solo transiente

y entonces el grado de fosforilación de los sustratos de la proteínas quinasa dependientes de Ca^{++} /calmodulina declina también a los valores basales originales, aunque con un tiempo de relajación mayor que el observado para el Ca^{++} citosólico (Barrett y col, 1988).

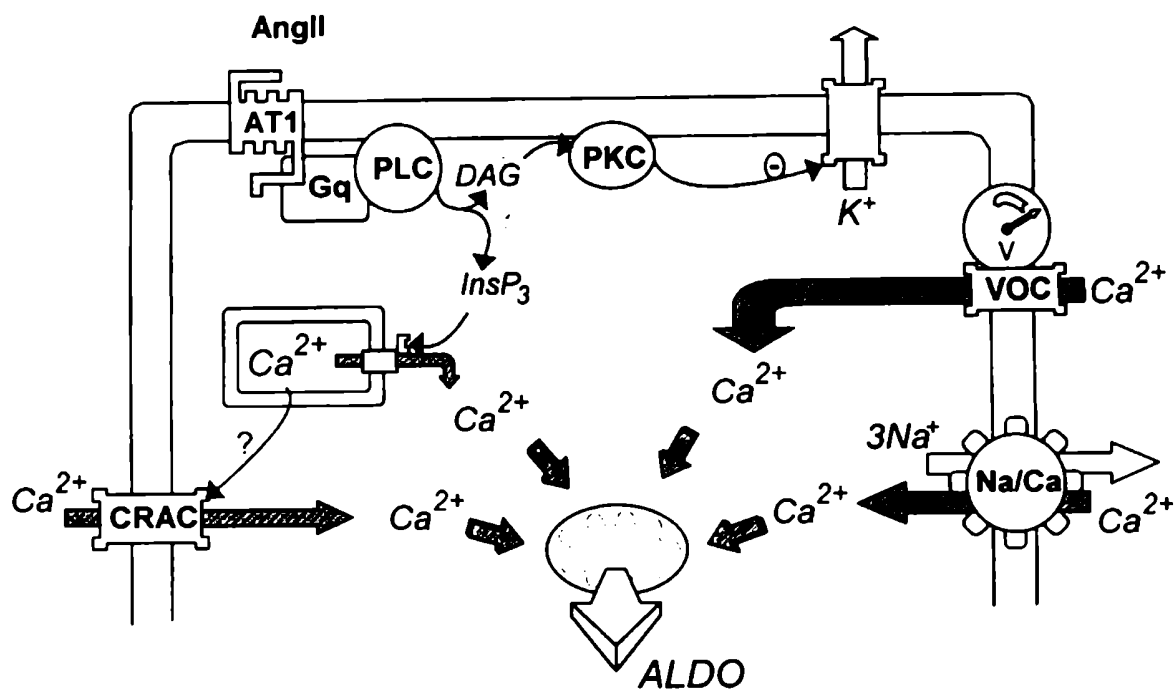
Por otro lado, en contraste con la iniciación, el mantenimiento de la respuesta celular por AII es dependiente del Ca^{++} extracelular, esto se justificaría en base a un modelo que postula que durante la fase sostenida de la respuesta, la alta velocidad del Ca^{++} que cicla a través de la membrana plasmática aumenta la concentración de Ca^{++} en la región que se halla justo debajo de la membrana plasmática, llamada dominio submembrana. Debido a que el Ca^{++} aumentado en este dominio no es conducido al citosol, no puede activar los elementos dependientes de Ca^{++} sino que más bien regula la actividad de enzimas calcio-sensibles asociadas a la membrana plasmática tales como la bomba de Ca^{++} y la PKC.

Se han propuesto tres vías diferentes para la entrada de calcio en las células de ZG luego del agregado de AII: los canales de calcio operados por voltaje (VOC), los canales de calcio activados por la liberación de calcio intracelular mediada por la generación de IP_3 (CRAC), esta es la vía más importante de entrada de calcio activada por la hormona (Burnay y col, 1994), y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (fig. 8). Se ha demostrado que AII despolariza suficientemente las células de ZG como para abrir canales de Ca^{++} de bajo umbral tipo T (Capponi y col, 1994).

e) Participación de la PKC.

La PKC está presente en la corteza adrenal (Kojima y col, 1984a; Vilgrain y col, 1984) y los factores necesarios para su activación, diacilglicerol y movilización

FIGURA 8: Vías posibles para el influjo de calcio inducido por AngII.



Referencias: CRAC: canal de calcio activado por la liberación intracelular de calcio, VOC canal de calcio dependiente del voltaje, Na^+/Ca^{2+} intercambiador Na^+/Ca^{2+} .
(Fuente: Capponi y col, 1994)

de Ca^{++} son estimulados por AII (Quinn y Williams, 1988). Sin embargo la participación de la PKC en la secreción de aldosterona estimulada por de AII es aún motivo de controversia.

En un amplio número de sistemas, la activación de la PKC por ésteres de forbol resulta en la translocación de la PKC desde el citosol a la membrana. Por su parte AII es capaz de producir una pequeña pero consistente translocación de la PKC, lo cual sugiere que AII puede activar la PKC en las células de glomerulosa adrenal de rata. Este efecto menor de AII sobre la PKC en la adrenal de rata difiere de la marcada y sostenida translocación reportada en células adrenales bovinas (Lang y Valloton, 1987). A pesar de que es claro que AII causa translocación de la PKC y probablemente su activación en la zona glomerulosa adrenal de rata, aún no está claro si esta activación es parte del mecanismo de síntesis de aldosterona. Estudios recientes (Kojima y col, 1994) indican un rol para la PKC no sólo en la fase sostenida sino también en la respuesta inicial a AII.

Por lo menos tres isoformas diferentes de la PKC han sido detectadas en ZG de rata: α , δ , ξ (Capponi y col, 1994) cuyo rol permanece aún por ser determinado. La identificación de los sustratos endógenos de la PKC en células de ZG ayudará a clarificar la función de esta enzima en la activación de la esteroidogénesis.

La activación de la PKC juega un rol en los efectos a largo plazo de AII tales como la acción trófica en las células de glomerulosa y en el crecimiento adrenal. En este aspecto AII media el incremento de las enzimas esteroidogénicas y de los receptores para AII que ocurre durante la restricción de sodio (Aguilera y Catt, 1983), y se ha demostrado que este péptido tiene actividad mitogénica en cultivos celulares (Gill y Col, 1977).

Por otro lado el DG formado luego de la acción de la PLC es rico en AA (Antonipillai y col, 1989). A pesar de que existe evidencia de que All puede incrementar la liberación de AA en las células de ZG adrenal (Nadler y col, 1987), el rol preciso de este ácido graso y sus productos derivados en la esteroidogénesis no ha sido aún esclarecido. También ha sido reportado que los ácidos grasos liberados pueden activar la PKC (Kojima y col, 1994).

Un requisito para entender el rol de los eicosanoides en la regulación de la biosíntesis de aldosterona es el conocimiento del metabolismo del AA en dichas células, lo cual será discutido extensamente en la sección siguiente.

f) Regulación por All del paso limitante de la esteroidogénesis, conversión de colesterol en pregnenolona.

La estimulación de la síntesis de aldosterona por All en la ZG tiene características en común con la estimulación de la síntesis de glucocorticoides por ACTH en la ZF.

La estimulación de la síntesis de aldosterona por All depende de la síntesis proteica, la cual al igual que en ZF se cree que es requerida para la entrega de colesterol al Cit P450_{scc}. La estimulación de la ZG con All y db-AMPc produce la aparición de dos proteínas de 28.5 kDa similares en peso molecular y punto isoeléctrico las proteínas pp30 y pp30' descritas por Epstein (Elliott y col, 1993) , el tratamiento con All y db-AMPc produce la desaparición de dos proteínas de 28.5 kDa (p30 y p30' en el estudio de Epstein), las cuales pueden ser observadas en células controles (Elliott y col, 1993). Además All y db-AMPc producen la aparición de cuatro proteínas de 30 kDa y pl: 7,05, 6,67, 6,53 y 6,53. Aún no se conoce si existe una relación entre la proteínas de 30 y 28.5 kDa pero de ser así, nuevamente

sugeriría que sería necesario un evento proteolítico en la generación del factor lábil estimulante de la esteroidogénesis como fue descrito en ZF de rata y una línea tumoral de células de Leydig (Epstein y col, 1991, Stocco y Sodeman, 1991, Elliott y col, 1993).

III-4: Potasio.

El potasio estimula la secreción de aldosterona en células de glomerulosa adrenal y a su vez, este esteroide incrementa la excreción renal de potasio, por lo tanto no es sorprendente que exista una relación continua entre el nivel circulante de K^+ y el de aldosterona.

La respuesta *in vitro* de las células de zona glomerulosa al K^+ es mayor que la que éstas presentan a Ang (Braley y Williams, 1977; Williams y Braley, 1977).

A diferencia de otros secretagogos, el K^+ externo actúa a nivel de la membrana plasmática alterando la fuerza conductora para el K^+ a través de ella, modificando de esta manera, el potencial de membrana (Quinn y col, 1987). La despolarización de la membrana observada en respuesta a pequeñas variaciones en la concentración de K^+ (de 4 a 8 mM) activa canales para calcio dependientes de voltaje localizados a nivel de la membrana plasmática como paso inicial de transducción (Kojima y col, 1985b). El incremento en el influjo de calcio da como resultado un aumento en la concentración de calcio citosólico libre que está bien correlaciona con la producción de aldosterona (Braley y Williams, 1977; Capponi y col, 1984; Connor y col, 1987). Las mediciones con Quin 2 demostraron que el aumento en los niveles citoplasmáticos de calcio libre es rápido y se mantiene mientras dure la estimulación. La cinética de la variación en el calcio citosólico libre es consistente con que el incremento es mediado por un canal de Ca^{++} de bajo

umbral (Johnson y col, 1989). En el caso del potasio la tendencia actual parece indicar que el calcio involucrado en acoplar el estímulo y la respuesta proviene exclusivamente del medio extracelular (Kojima y col, 1984 b; Kojima y col, 1985 a).

Recientemente se ha demostrado en células de zona glomerulosa despolarizadas (Johnson y col, 1989) que el aumento en la concentración de Ca^{++} citosólico libre por sí solo es un estímulo para la secreción de aldosterona *in vitro* y que el bloqueo de la entrada del Ca^{++} a las mitocondrias previene la estimulación (Capponi y col, 1988).

La esteroidogénesis estimulada por potasio también requiere de la síntesis proteica (Saruta y col, 1972). La elevación del potasio en el medio extracelular también provoca un pequeño incremento en la aparición de las proteínas fosforiladas de 28,5 y 30 kDa descritas para la acción de AII. Probablemente el potasio promueva la fosforilación de estas proteínas actuando a través de la quinasa dependiente de Ca^{++} y calmodulina (Elliott y col, 1993).

SECCION IV: BIOQUIMICA DEL ACIDO ARAQUIDONICO; METABOLISMO, REGULACION Y PARTICIPACION EN LA FUNCION CELULAR.

IV-1: Síntesis del ácido araquidónico.

En muchos tipos celulares se ha observado que la activación de receptores lleva a la producción de ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana (Burgoyne y Morgan, 1990).

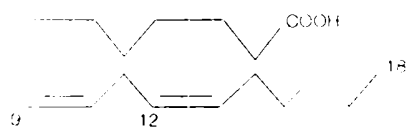
El AA y sus varios metabolitos (eicosanoides) actúan de diferentes maneras como mensajeros intra e inter celulares. Debido al rol clave que el AA juega en el metabolismo celular, los niveles de AA libre (sin esterificar) son regulados a través de caminos múltiples e interconectados. La concentración de AA libre en las células en reposo es desconocida pero se cree que se mantiene a niveles bajos. (Irvine, 1982).

El AA es formado por las células a partir de los ácidos grasos poliinsaturados esenciales de la familia del ácido linoleico (AL, 18:2 (9,12)). El AL cuando se desatura (fig 9) por acción de una $\Delta 6$ desaturasa (Mandon y col, 1986), da origen al ácido gamma linolénico con tres dobles ligaduras (GL 18:3 (6,9,12)). Del ácido GL se genera por elongación el ácido dihomogammalinolénico con 20 carbonos (DHGL 20:3 (8,11,14)), el cual por ulterior desaturación catalizada por una $\Delta 5$ desaturasa (Mandon y col, 1986) forma el ácido araquidónico (fig.. 9) con 20 carbonos y cuatro dobles enlaces (AA 20:4 (5,8,11,14)).

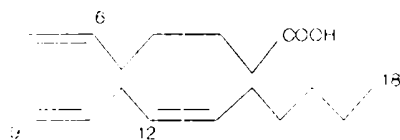
IV-2: Regulación de la liberación de AA.

Los mecanismos usualmente considerados para el control de los niveles de AA libre involucran (figura 10) la activación de una fosfolipasa A_2 (PLA_2) con

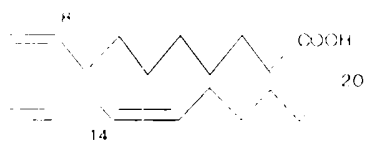
FIGURA 9: Estructura de los ácidos linoleico, gamma-linolénico, dihomo-gamma-linolénico y araquidónico.



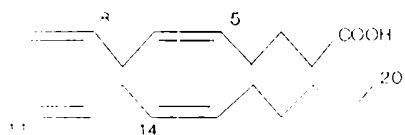
Ac. linoleico



Ac. gamma-linolénico



Ac. dihomo-gamma-linolénico



Ac. araquidónico

generación directa de AA, o la activación de la fosfolipasa C y la producción de AA a partir de diacilglicerol por una diacilglicerol lipasa (Bell y col, 1979).

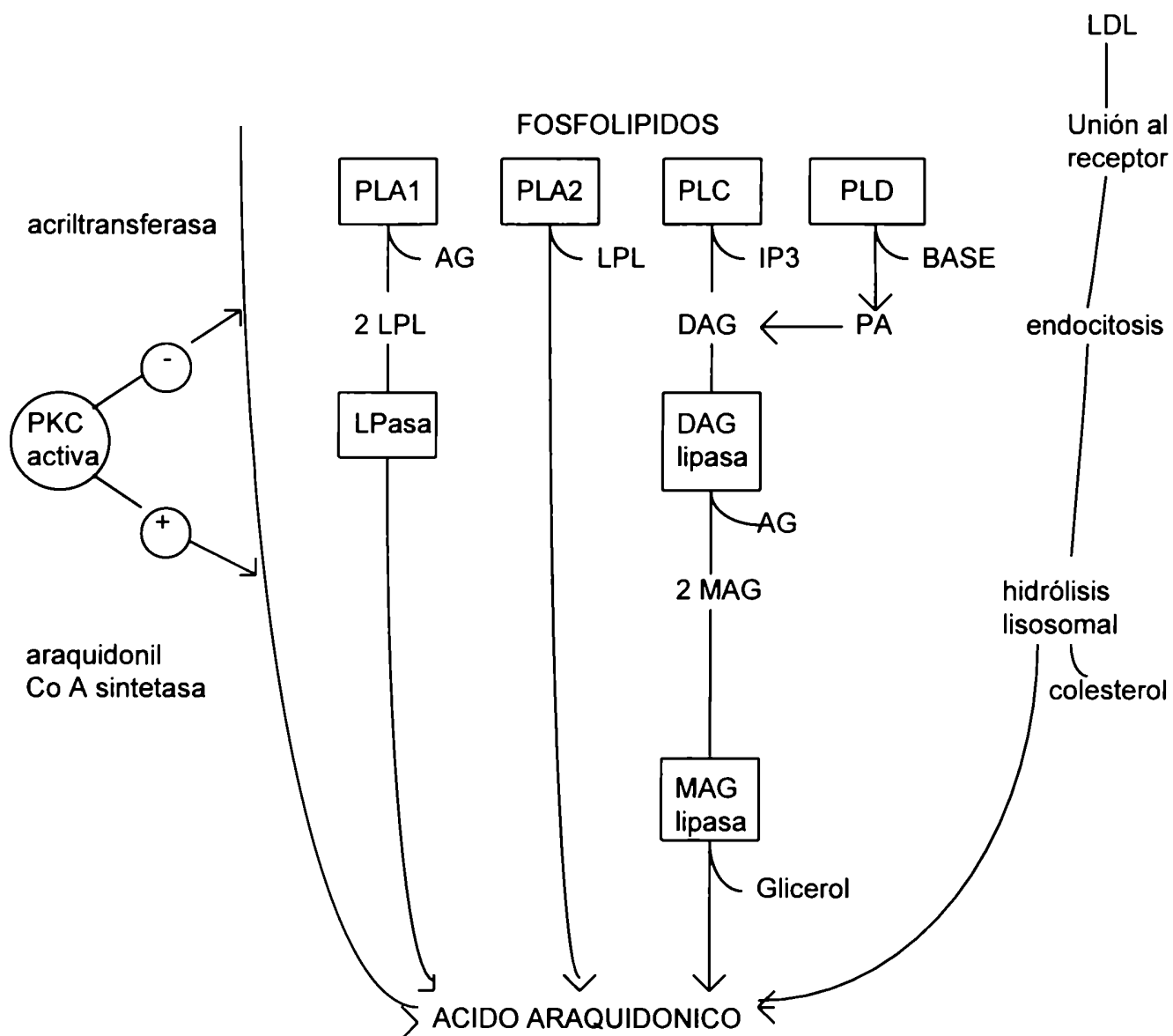
Alternativamente, el AA puede ser generado (fig. 10) por acción de una fosfolipasa A_1 (PLA_1) sobre distintos fosfolípidos o a partir de ácido fosfatídico, el cual a su vez se formaría por acción sobre los fosfolípidos de una fosfolipasa D (PLD) o por acción de una DG-quinasa (Exton, 1990).

Los niveles de AA libre también pueden ser modificados variando su captación por la vía del receptor para lipoproteína de baja densidad (Habenicht y col, 1990) y a través de la desacilación/reacilación de fosfolípidos. Existe alguna evidencia de que la PKC incrementa la liberación de AA, debido a una inhibición en las enzimas involucradas en la reacilación (Fuse y col, 1989).

La fosfolipasa A_2 (PLA_2 EC3.1.1.4), la cual hidroliza ácidos grasos unidos a la posición *sn* -2 de los glicerofosfolípidos, ha sido detectada universalmente en una variedad de células de mamíferos (Kudo y col, 1993). La liberación de AA es el paso limitante para la generación de eicosanoides. La comprensión de los mecanismos regulatorios de la PLA_2 es de crucial importancia para el esclarecimiento de las bases moleculares de las señales de transducción, incluyendo la generación de mediadores lipídicos a partir de membranas biológicas.

Las PLA_2 s son una clase de enzimas de diversa localización, regulación, secuencia y dependencia de cationes divalentes. Hasta el presente se ha determinado la estructura primaria de cuatro tipos de PLA_2 de mamíferos. Se denominan tipo I aquellas cuya estructura es similar a la PLA_2 presente en el veneno de *Elapidae* y *Hidrofidae* y tipo II a las que poseen similitud con las del

Figura 10: Vías involucradas en la liberación de los niveles de ácido araquidónico libre.



veneno de *Crotalidae* y *Viperidae* (Heinrikson y col, 1977). Las fosfolipasas pancreáticas aisladas de distintos animales tienen características similares a las enzimas de tipo I de veneno de víbora; mientras que varios tipos celulares incluyendo plaquetas, mastocitos, hepatocitos y células de músculo liso secretan fosfolipasas que se parecen a las enzimas de veneno de víbora tipo II. Todas las enzimas tradicionales del grupo I, II y III han sido aisladas como enzimas extracelulares que tienen alto contenido de puentes disulfuro, bajo peso molecular (14 kDa) y requieren calcio para la catálisis. La homología en la secuencia es el criterio para asignar una PLA₂ a uno de estos grupos.

Recientemente se han identificado a partir de diversas fuentes nuevos tipos de PLA₂ en base a sus propiedades bioquímicas e inmunoquímicas. Estas enzimas tienen pesos moleculares relativamente mayores que las anteriores y se activan en presencia de cantidades submicromolares de Ca⁺⁺. Estas actividades enzimáticas, las cuales preferencialmente hidrolizan AA, se encuentran localizadas en el citosol, translocan a la membrana en una manera calcio dependiente, y su estructura primaria no presenta ninguna similitud con la tipo I, II, o III (Kudo y col, 1993). La purificación, secuenciación y clonado de la PLA₂ citosólica en células U937 demostró que la misma posee un peso molecular de 85 kDa y muestra un peso molecular anormalmente alto de aproximadamente 110 kDa en geles de poliacrilamida con SDS (Dennis E., 1994). Los resultados del mapa peptídico de esta PLA₂ reveló la presencia de múltiples sitios de fosforilación sugiriendo que la PLA₂ puede ser fosforilada por múltiples quinasas y se comprobó que la fosforilación de la enzima *in vivo* aumenta su actividad *in vitro* (Qiu y col, 1993).

La PLA₂ como enzima efectora hidroliza el AA contenido en fosfolípidos tales como fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS),

fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y plasmalógenos para generar AA y lisofosfolípidos. Los productos generados por acción de la PLA₂ son precursores de moléculas que se producen en respuesta a un estímulo. El ácido lisofosfatídico es precursor para la síntesis de PA, que parece controlar muchas funciones celulares.

Numerosos solutos disminuyen la acción de la PLA₂. En la mayoría de los casos esta inhibición es no competitiva y puede deberse a alguno de los siguientes mecanismos (Jain y Berg, 1989): 1) Unión del inhibidor a la enzima, la cual desplaza el equilibrio reduciendo la cantidad de enzima catalíticamente activa. 2) Agentes lipofílicos que modifican las propiedades de fase y la densidad de carga de la interfase donde opera la PLA₂. Cambios de este tipo son inducidos por solventes orgánicos, detergentes, cationes anfifílicos, fenotiazinas, anestésicos locales, ácidos grasos, mepacrina y quinacrina. 3) Proteínas como la lipocortina o las calpactinas que solubilizan los fosfolípidos de la interfase reduciendo así la actividad de la PLA₂. 4) Los glucocorticoides presumiblemente inhiben la biosíntesis de la PLA₂. 5) Los aniones solubles en agua tales como heparina y sulfato inhiben la unión de la PLA₂ a la interfase. 6) Modificaciones covalentes del aminoácido histidina localizado en la posición 48, el cual media la catálisis, anulan la actividad de la enzima. 7) Análogos del sustrato, de los productos o de los intermediarios de la reacción se comportan como inhibidores competitivos de la enzima.

Se han postulado algunos mecanismos para la activación de la PLA₂ los cuales incluyen disponibilidad de Ca⁺⁺ intracelular (Van der Bosch, 1980), activación de quinasas de proteína (serina -treonina) (Axelrod, 1990, Piomelli y Greengard, 1991), activación de tirosinas quinasas (Qiu y col, 1993), acoplamiento a proteínas G (Axelrod y col, 1988), proteínas reguladoras positivas (Clark y col, 1987) o negativas (Qiu y col, 1993).

Aparentemente existen múltiples proteínas G involucradas en la activación de la PLA₂. Algunas de éstas se acoplan directamente con una PLA₂ efectora, otras modularían la actividad de la PLA₂ abriendo canales de Ca⁺⁺ o por la liberación de Ca⁺⁺ a partir de depósitos intracelulares introducidos por IP₃. Es sabido que el veneno de víbora melitina es un eficiente estimulador de la PLA₂ (Haberman, 1972). En un intento para encontrar la contraparte en mamíferos para esta proteína de veneno de víbora, se clonó el ADNc de una proteína activadora de la PLA₂ (PLAP) haciendo una búsqueda en una biblioteca de expresión con anticuerpos anti-melitina (Peitsch y col, 1993). Recientemente, se ha caracterizado una proteína novel asociada a organelas con secuencia similar a la subunidad β de la proteína G y se ha identificado a PLAP como un miembro de la superfamilia de la β transducina (Peitsch y col, 1993). La homología entre PLAP y la β-transducina refuerza el concepto de que las proteínas G juegan un rol en la activación de la PLA₂.

Se ha postulado que el AA podría actuar como un segundo mensajero en los mecanismos de transducción de señales (Naor, 1991). Los segundos mensajeros, como ya se ha discutido, ejercen su función por activación de proteínas quinasas; en este contexto se mostrado la activación de la PKC por AA (Naor, 1991).

IV-3: Metabolismo del AA.

La liberación de AA es el paso limitante para la síntesis de eicosanoides (Jain y Berg, 1989). Ellos modulan procesos tan diversos como la agregación plaquetaria, shock anafiláctico, dolor, termogénesis, inflamación, flujo de sangre al cerebro, relación huésped - parásito y catabolismo de lipoproteínas. Recientemente se ha postulado también que la PLA₂ podría actuar como moduladora en la

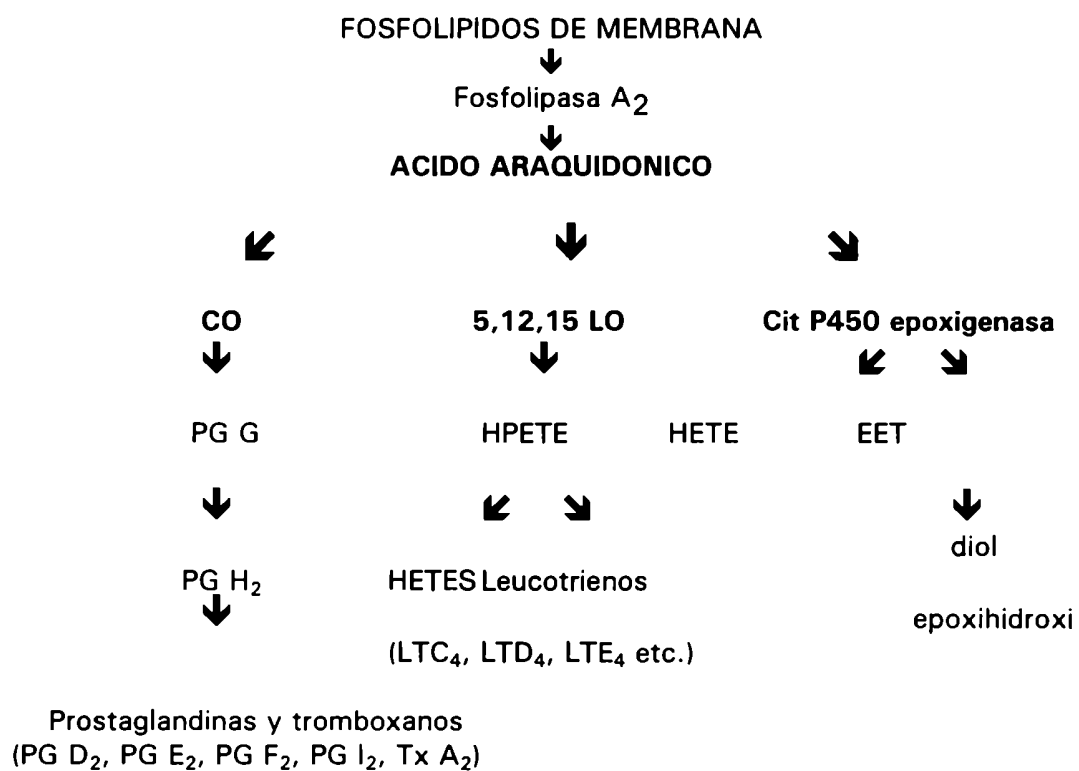
infección viral y en la transmisión de señales intracelulares a través del recambio del fosfatidil inositol y las proteínas G (Irvine, 1982).

El AA libre puede ser metabolizado (fig. 11) por la vía de las cicloxigenasas (CO) para dar prostaglandinas (PG) y tromboxanos, por la de las lipoxigenasas (LO) para dar leucotrienos (LT) e hidroperóxidos (HETE) o por la epoxigenasa. Esta última enzima convierte el AA, por un mecanismo dependiente de NADPH, en una variedad de productos oxigenados (fig. 11) tales como HETE (hidróxido) y EETE (epóxido) y sus productos de hidrólisis ácido dihidroxieicosatetraénicos (DHTs) o dioles tanto como ácidos w y $w-1$ hidroxilados (Needleman y col, 1986).

El AA y ciertos otros ácidos grasos poliinsaturados pueden ser transformados en PG por la enzima prostaglandina endoperóxido sintetasa (PES). La actividad cicloxigenasa de la PES inserta 2 moléculas de oxígeno en el AA para dar 15-hidroxiperoxi-9-11-endoperóxido (fig. 11) con un anillo sustituido ciclopentano (PG G_2), luego la actividad de peroxidasa de PES convierte la PG G_2 en un 15-hidroxi derivado análogo (PG H_2). Las actividades de cicloxigenasa y peroxidasa de la PES residen en una misma proteína (Needleman y col, 1986).

En etapas posteriores (fig. 11) se originan las prostaglandinas primarias de las series E y D (quizás enzimáticamente por acción de isomerasas) y de la F; la prostaglandina I_2 inestable (prostaciclina) se forma por acción de una sintetasa específica y lo mismo ocurre en el caso del compuesto también inestable denominado tromboxano A_2 (fig. 11). Los agentes anti-inflamatorios no esteroideos inhiben la actividad cicloxigenasa pero no la actividad hidropoxidásica de la PES. La reacción con aspirina produce la acetilación de la enzima resultando en una inhibición irreversible, ciertos otros ácidos grasos acetilénicos tales como el ácido

FIGURA 11: Cascada metabólica del AA a partir de fosfolípidos de membrana.



eicosa 5, 8, 11, 14 tetraenoico, también inhiben la enzima posiblemente actuando como sustratos (Needleman y col, 1986).

Las lipoxigenasas catalizan la incorporación de una molécula de oxígeno en los ácidos grasos poliinsaturados conteniendo un sistema 1,4 cis - cis pentadieno. La especificidad regional de las LO se designa por el número del átomo de carbono que porta el grupo hidroperóxido.

Los hidroxiperóxidos (HPETEs) inestables producidos por las LO son reducidos a sus correspondientes HETEs (fig. 11) por acción de una actividad de peroxidasa asociada con las LO.

Además de ser reducido a 5-HETE, el 5-HEPTE puede ser metabolizado a leucotrienos. El leucotrieno B₄ (LTB₄, Fig 11) es sintetizado por procesos sucesivos: i) formación inicial de 5-HPETE a partir de AA, ii) deshidratación del 5-HPETE a leucotrieno A₄ (LTA₄), iii) hidrólisis no enzimática del LTA₄ a LTB₄.

Las LO no son inhibidas por agentes antiinflamatorios no esteroideos pero si por ác. eicosatetraenoico (ETYA), ác. nordihidroguayarático (NDGA), BW 755C y otros compuestos (Van Wauwe y Goosens 1983).

IV-4: Rol de los metabolitos del AA en la esteroidogénesis.

Muchos estudios indican que los metabolitos del AA están involucrados en la regulación de la producción de aldosterona (Campbell y col, 1980, Enyedi y col, 1981, Kojima y col, 1985e, Nadler y col, 1987).

Se ha demostrado que la indometacina, un inhibidor de la CO, inhibe la liberación de aldosterona basal y la estimulada por AII en las mismas dosis en que inhibe la síntesis de PG en la glándula adrenal (Campbell y col, 1980 y Enyedi y col, 1981). En contraste, otros investigadores trabajando con indometacina o

meclofenamato no observaron estos efectos (Kojima y col, 1985e y Nadler y col, 1987). Trabajando con métodos radioquímicos y radioinmunoensayo (RIE) pudo observarse que las células de glomerulosa adrenal sintetizan PGI_2 , PGE_2 y $\text{PGF}_{2\alpha}$ como los metabolitos más importantes de la vía de las CO (Schwartz y Williams, 1983, Campbell y Gómez Sánchez, 1985). Por otro lado, se demostró que la liberación de aldosterona es estimulada por el agregado exógeno de PGI_2 y PGE_2 (Campbell y Gómez Sánchez, 1985). La AII en las mismas dosis que promueve la esteroidogénesis estimula la liberación de PGI_2 pero no de PGE_2 o $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Campbell y Gómez Sánchez, 1985), sin embargo las cantidades de estas prostaglandinas que se liberan son mucho menores que las concentraciones que promueven la liberación de aldosterona. A partir de estos resultados se concluyó que los metabolitos del AA por la vía de la CO no están involucrados en la regulación de la liberación de aldosterona.

Se ha sugerido que otras vías del metabolismo del AA estarían comprometidas en la regulación de la secreción de aldosterona. En este sentido se observó que los inhibidores de la LO reducen la producción de aldosterona estimulada por AII en la zona glomerulosa de la corteza adrenal (Kojima y col, 1985e, y Nadler y col, 1987) y que el agregado de 12 HETE y 12 HPETE restauran la secreción de AII durante el bloqueo de la LO (Stern y col, 1993). Además el agregado exógeno de 12 HETE o 12 HPETE estimula la producción de aldosterona (entre un 20 y un 50% sobre la producción basal), mientras que el 15 HETE y 15 HPETE no tienen efecto (Nadler y col, 1987). También pudo observarse que la glándula adrenal contiene metabolitos con las propiedades cromatográficas del 12 HETE y 15 HETE (Campbell y col, 1991). Estos resultados sugirieron que el 12 HETE estaría involucrado en la liberación de aldosterona estimulada por AII.

Los mismos autores demuestran también que el DG es en zona glomerulosa el precursor para la síntesis de 12HETE (Natajara y col, 1990). Aparentemente el 12 HETE ejercería su efecto provocando un pequeño aumento en la concentración de Ca^{++} citosólico libre a partir de un depósito intracelular (Stern y col, 1993), aún no se ha determinado si este efecto se ejerce directamente sobre los depósitos de Ca^{++} o necesita de algún otro mecanismo.

Estudios previos demostraron que las células de zona fasciculata de adrenal de rata sintetizan seis productos de la acción de la CO: PGE_2 y un derivado hidroxilado de ésta, PGF_{2a} y dos de sus derivados y el tromboxano B_2 (Hirai y col, 1985). El agregado de dosis crecientes de ACTH no estimula la formación de estos productos (Swartz y Williams, 1983 y Hirai y col, 1985). El pre-tratamiento de las células con indometacina inhibe la formación de estos productos de la CO en una manera dosis dependiente sin que se observen cambios en la producción de corticosterona estimulada por ACTH (Laychock y col, 1977; Swartz y Williams, 1983 y Hirai y col, 1985). A partir de estos datos parece poco probable que los productos CO jueguen un rol esencial en la esteroidogénesis estimulada por ACTH en células adrenocorticales de rata.

Resultados similares han sido reportados para células de Leydig. Se ha demostrado que el ovario y el testículo sintetizan prostaglandinas (Dix y col, 1984; Didolkar y col, 1987), sin embargo además de su posible rol en la ruptura folicular, su efecto fisiológico en estos tejidos permanece poco claro. Por otro lado se ha demostrado que los metabolitos de la lipoxigenasa pueden tener un rol en la esteroidogénesis testicular y (Dix y col, 1984). En células de Leydig de rata y en células tumorales se ha demostrado que los inhibidores de la LO inhiben la esteroidogénesis estimulada por LH y AMPc (Dix y col, 1984). Trabajos utilizando

un RIE para el LTB_4 han demostrado que este compuesto es sintetizado y secretado en células de Leydig (Sullivan y Cooke, 1985).

SECCION V: OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

La información expuesta en las secciones anteriores intenta resumir los conocimientos actuales sobre los diferentes mecanismos intracelulares de transducción de señales. Los pasos que siguen a la generación del segundo mensajero son diferentes para cada sistema de transducción pero todos conducen a la activación de quinasas de proteínas, desconociéndose cual es el producto intermediario entre la activación de dichas quinasas y la respuesta celular.

Asimismo, se ha destacado la importancia del ácido araquidónico y los productos de su metabolismo en la función celular dando especial énfasis a la relación de estos con la esteroidogénesis.

El objetivo del presente trabajo es estudiar si el AMPc, como segundo mensajero en el mecanismo de acción de hormonas que regulan la esteroidogénesis, genera un intermediario común con aquellas hormonas que estimulan la esteroidogénesis por vías independientes del AMPc. A su vez se estudiará cual o cuales son los productos intermediarios en dichos procesos y su localización intracelular.

Posteriormente se estudiará como la fosforilación de proteínas dependiente de AMP_c puede transmitir una señal específica a la mitocondria de las células esteroidogénicas para activar el paso limitante de la síntesis de esteroides.

Los antecedentes existentes en la bibliografía demuestran que proteínas mitocondriales, citosólicas y microsomales son posibles sitios para la fosforilación dependiente de AMP_c. Sin embargo en ninguno de estos estudios se ofrece una asociación directa entre la activación de la proteína quinasa A y la activación del clivaje de la cadena lateral del colesterol. En el presente trabajo se ha investigado el

sitio de acción de la PK A relacionándolo directamente con la estimulación de la esteroidogénesis.

Capítulo II:

MATERIALES Y METODOS

SECCION I: MATERIALES.

I-1: Materiales

Adrenocorticotrofina sintética (Synacthen): corticotrofina (1-24) tetracosapeptido (1 fmol corresponde a 0.3×10^{-6} UI de corticotrofina) y dexametasona, (9 - fluoro - 11 β ,17,21 - trihidroxi - 16 α -metilpregna - 1,4 - dieno - 3,20 - diona), fueron generosamente donadas por el Dr. W. Rittle, Ciba Geigy, Basilea, Suiza.

La hormona luteinizante humana (Ler-907) fue generosamente provista por "The Hormone Distribution Comitee, NIAMDD, National; Institute of Health", Bethesda, MD. EE.UU.

La microscopía electrónica fue realizada en el Friedrich Miescher - Institut, Basilea, Suiza.

Las células Y₁ y las dos cepas mutantes fueron donadas por el Dr. Bernard Schimmer, Banting and Best Department of Medical Research, Universidad de Toronto, Toronto, Canadá.

El suero anti-testosterona fue obtenido mediante inmunización de ovejas a intervalos de dos semanas con un conjugado de testosterona-globulina preparado por acoplamiento de la carboximetiloxima de la testosterona a gamma globulina en presencia de carboxiamida soluble.

El suero anti-testosterona utilizado posee una constante de asociación de $4,5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ y liga 50 a 60% de la ^3H testosterona, utilizándolo a una dilución final de 1:2500.

Los anticuerpos anti-corticosterona y anti-progesterona fueron comprados a Radioassay System Laboratories Inc, Carson, California, EE.UU. y utilizados a una

dilución final de 1:37.500 para el caso del anti-corticosterona y 1:42.000 para el anti-progesterona.

(1,2 - $^3\text{H}(\text{N})$) testosterona (40 Ci/nmol), (1,2,6,7 - $^3\text{H}(\text{N})$) corticosterona (112 Ci/nmol), (1,2- $^3\text{H}(\text{N})$) progesterona (45,6 Ci/mmol), (5,6,8,9,11,12,14,15 - $^3\text{H}(\text{N})$) ácido araquidónico (190 Ci/mmol) y mezcla centelleadora Omnifluor fueron obtenidos de New England Nuclear Corporation, Boston, MA., EE.UU.

3 isobutil - 1 metilxantina fue obtenido de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, W. I., NY, EE.UU.

Carbón (Norit A) fue obtenido de Serva.

Medio de cultivo 199 fue obtenido de Difco Laboratories, Detroit, Mi, EE.UU.

Tripsina, liofilizada de páncreas bovino N° 1189542 e Inhibidor de tripsina, de poroto de soja, fueron comprados a Boehringer Mannheim GmbH, Alemania Federal.

Colagenasa de Tipo I fue adquirida a Worthington Biochemical Corp. Freehold, NY, EE.UU.

D-Glucosa a BHD, Biochemicals Ltd., Inglaterra.

3',5'adenosina-monofosfato cíclico, quinasa de proteínas AMP_C dependiente de músculo de ratón con una actividad de unión de 0,02 pmol $\text{AMP}_\text{C}/\mu\text{g}$ proteínas; inhibidor de proteína quinasa AMP_C dependiente obtenido de músculo de conejo, según protocolo de purificación de Walsh, N^6 -monobutil AMP_C , 8-bromo AMP_C , seroalbúmina bovina (fracción V), seroalbúmina bovina libre de ácidos grasos, silicona, progesterona, testosterona, ácido araquidónico, L-fosfatidilcolina, Tris-hidroximetilamino-metano, bromuro de bromofenacilo, ácido nordihidroguayarático, ácido cafeico, esculetina, quinacrina, fosfatidilserina, ácido fosfatídico,

lisofosfatidilcolina y angiotensina II, fueron adquiridas a Sigma Chemical Co, Saint Louis, MJ, EE.UU.

Cloruro de magnesio ($\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), cloruro de potasio, cloruro de calcio ($\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), fosfato mono y disódico, sulfato de magnesio, amoníaco, metanol, dioxano, etanol absoluto, ácido acético, fueron obtenidos de Merck Argentina.

Manitol fue comprado a Mallinckrot, NY, EE.UU.

Ciclohexano, tolueno y diclorometano fueron comprados a Sintorgan.

El ácido 5,8,11,14 - eicosatetraínoico fue generosamente donado por Hoffman- La Roche Inc., EE.UU.

Fosfatidilinositol fue comprado a Koch Light Laboratories Ltd.

Placas de Sílica Gel F 254 fueron adquiridas a Merck, Alemania Federal.

I-2: Animales.

Se utilizaron ratas macho de 60-120 días de la Cepa Wistar mantenidas por lo menos la semana previa al experimento con luz y temperatura controladas, agua y alimento balanceado (purina) administrados *ad libitum*.

SECCION II: OBTENCION Y ESTIMULACION DE FRACCIONES SUBCELULARES DE GLANDULA ADRENAL.

II-1: Obtención de zona fasciculata (ZF) y zona glomerulosa (ZG) de adrenal de rata.

Los niveles de corticosterona en la sangre y en las adrenales de rata presentan un ritmo circadiano con niveles mínimos y máximos en la mañana y en la tarde, respectivamente (Murakami y Takahashi, 1983).

Para suprimir tanto estos efectos fisiológicos como la producción de corticosterona inducida por el stress en el momento del sacrificio se utilizaron ratas pre-tratadas con dexametasona 0,001% p/vol en el agua de bebida durante las 16 horas previas al momento de ser utilizadas. Los controles realizados utilizando células de Leydig aisladas demostraron que la respuesta esteroideogénica en los animales tratados con dexametasona es del mismo orden que en los animales sin tratamiento.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación, las adrenales inmediatamente disecadas, liberadas del tejido graso circundante, colocadas en recipientes sumergidos en hielo y decapsuladas para obtener la zona fasciculata y de la cápsula la zona glomerulosa.

Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo a temperatura entre 0-4°C.

II-2: Estimulación de ZF y ZG *in vivo* por acción de ACTH.

Un grupo de animales fue inyectado subcutáneamente con 200 µg de ACTH (Synacthen) / kg. disuelto en NaCl 0,9 % p/vol y sacrificadas luego de 30 minutos cuando las adrenales estaban completamente estimuladas como lo demostraban

los niveles de corticosterona sérica alcanzados (pre-inyección: $12,0 \pm 1,7$ nM corticosterona, post-inyección: $635,0 \pm 152,0$ nM corticosterona).

Las ratas controles fueron inyectadas con NaCl 0,9% y en todos los casos las adrenales fueron disecadas y decapsuladas según lo expuesto más arriba.

II-3: Estimulación de la ZG y ZF *in vitro* por acción de ACTH y AII.

Las incubaciones de ZG *in toto* se llevaron a cabo en amortiguador Krebs-Ringer bicarbonato, 0,01 M de glucosa y 0,5% p/vol de albúmina sérica bovina (BSA) equilibrado con 5% CO₂ y 95% O₂ (carbógeno) previamente a ser usado, en tubos de plástico, en un baño termostatzado a 37°C con una agitación de 100 ciclos/minuto y con o sin el agregado de 10⁻⁷ M AII, durante dos horas.

Para la estimulación *in vitro* de la ZF se utilizaron glándulas adrenales provenientes de ratas tratadas con dexametasona según lo especificado más arriba. La incubación se llevó a cabo en amortiguador Krebs Ringer bicarbonato utilizando en todos los casos ACTH 10⁻¹⁰ M procediéndose de igual manera que para la incubación de la ZG.

En ambos casos, finalizada la incubación, se centrifugó a 600xg por 5 minutos, se tomaron muestras de los sobrenadantes para la determinación de aldosterona y corticosterona por radioinmunoensayo (RIE) y el tejido fue homogeneizado como se detalla más abajo. La determinación de corticosterona y aldosterona por RIE en el medio de incubación de la ZF estimulada con ACTH indicó valores no detectables de aldosterona, permitiendo descartar una posible contaminación con ZG.

II-4: Homogeneización de ZF y ZG.

Cuartos de adrenales decapsuladas conteniendo la ZF de animales tratados o no con ACTH *in vivo* o *in vitro* se homogeneizaron en un homogeneizador de vidrio con émbolo de teflón conteniendo un mililitro de medio A: (270 mM Manitol; 10 mM Tris-HCl pH 7,4) por cada cinco adrenales.

Las cápsulas adrenales conteniendo la ZG, estimulada o no *in vivo* con ACTH o *in vitro* con All, se homogeneizaron también en un homogeneizador vidrio/teflón con 0,5 ml de medio A por cada cinco adrenales.

II-5: Fraccionamiento subcelular.

Los homogenatos provenientes de la ZF se centrifugaron a 800xg. El sedimento conteniendo núcleos, restos de células y membranas celulares (fracción pre-mitocondrial) fue lavado una vez y luego resuspendido en 0,5 ml de medio A (100 μ l/adrenal).

Del sobrenadante de 800xg se obtuvo la fracción mitocondrial por centrifugación a 9000xg durante 20 minutos, el sedimento fue lavado y resuspendido con 1 ml de medio A (200 μ l/adrenal).

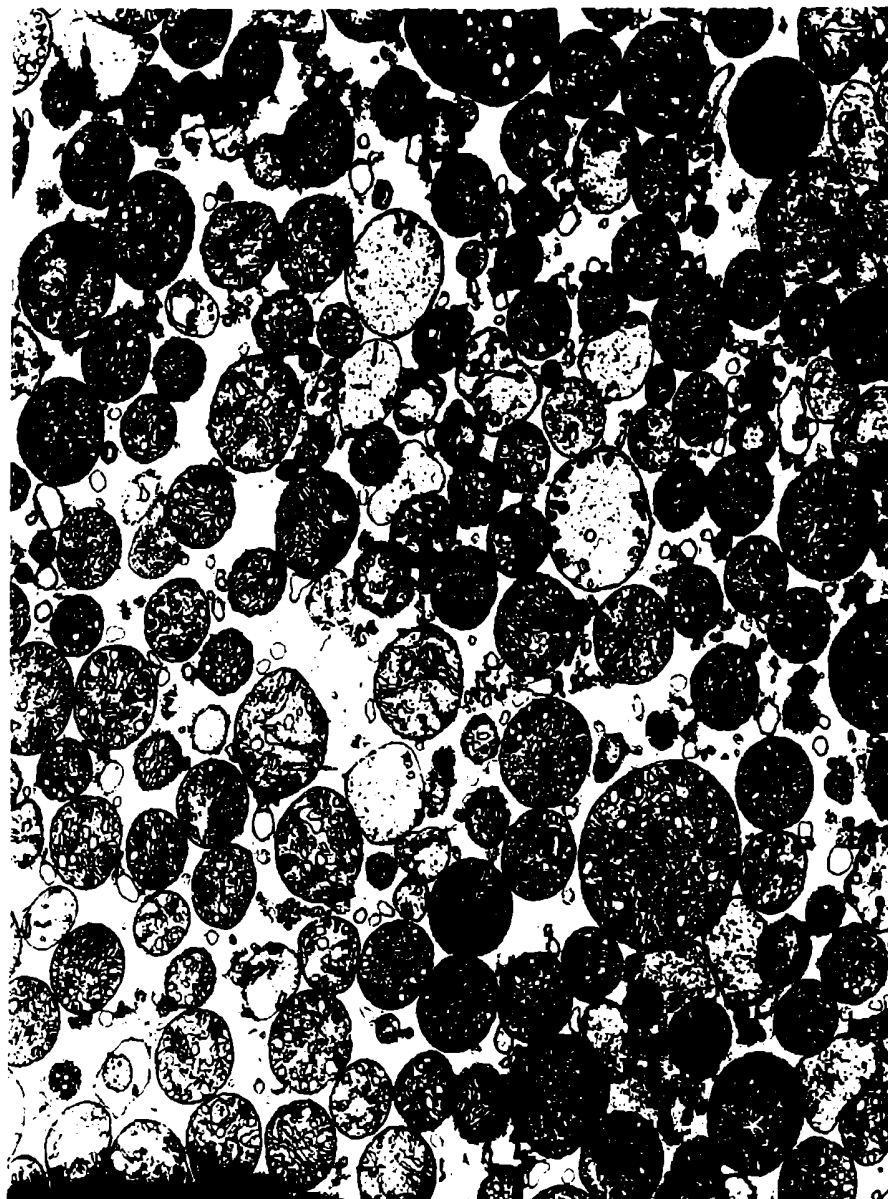
El sobrenadante de 9.000xg conteniendo el citosol y partículas microsomales (fracción post-mitocondrial, PMTS) fue centrifugado a 105.000xg por 60 minutos para obtener el sedimento de 105.000xg y el citosol (CS). El sedimento fue lavado con medio A y resuspendido con 0,5 ml de dicho medio (100 μ l/adrenal).

Para los homogenatos provenientes de la ZG se procedió de igual manera y luego de cada centrifugación el sedimento correspondiente fue lavado y resuspendido con 50 μ l/adrenal para los sedimentos pre-mitocondrial y microsomal y con 100 μ l/adrenal para el sedimento mitocondrial.

Los sobrenadantes post-mitocondriales y los citosoles provenientes de adrenales controles y estimuladas mostraron la misma cantidad de proteínas por el método de Lowry (Lowry y col, 1951) con BSA como standard (Para la ZF: PMTS: 1170 ± 95 , PMTS ACTH: 1200 ± 100 , CS: 850 ± 35 , CS ACTH: 920 ± 52 μg de proteínas/adrenal; para la ZG: PMTS 280 ± 11 , PMTS ACTH: 306 ± 10 , CS 249 ± 6 , CS ACTH: 255 ± 5 μg de proteínas/ adrenal).

Para la realización del ensayo de recombinación que se describe más adelante se consideró muy importante verificar que las mitocondrias estuvieran intactas. Para ello una alícuota de la fracción mitocodrial obtenida luego de realizar el fraccionamiento subcelular que acabamos de describir fue sometida a microscopía electrónica. Como puede observarse en la figura 12 las mitocondrias presentes en la preparación se hallaban intactas.

FIGURA 12: Microscopía electrónica de la fracción mitocondrial aislada de ZF de glándula adrenal.



Microfotografía electrónica del sedimento de 9000xg (fracción mitocondrial) obtenido como se describe más arriba. 22.100x.

SECCION III: ENSAYO PARA LA MEDICION DE LAS ACTIVIDADES ESTEROIDOGENICAS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES SUBCELULARES.

III-1: Incubación de las distintas fracciones subcelulares.

Se utilizó un ensayo libre de células para la medición de factores esteroideogénicos hormono-dependientes presentes en fracciones subcelulares extramitocondriales, proveyendo un nexo entre la acción hormonal y la reacción de clivaje que tiene lugar en la membrana interna mitocondrial.

La pregnenolona, que es el primer producto producido por el clivaje de la cadena lateral del colesterol, es rápidamente transformada en la adrenal de rata a Δ 4-3-oxo-esteroides y a sus derivados 11 β - 18- 19- y 21- hidroxilados.

La conversión de P_5 en progesterona es una reacción en dos pasos que tiene lugar tanto en el compartimento mitocondrial como en el microsomal (Kahnt y col, 1974).

Las hidroxilaciones de la progesterona son catalizadas por oxidasas de función mixta que contienen citocromos P450 diferentes al Cit P450_{scc}. Las 17 α - y 21- hidroxilasas están localizadas en el compartimento microsomal, 11 β -, 18- y 19- hidroxilasas se hallan en las mitocondrias, posiblemente con algunas excepciones dependiendo del sustrato y de las especies (Kahnt y col, 1974).

Para estudiar la neosíntesis de pregnenolona y progesterona con precisión resulta muy importante usar inhibidores apropiados del metabolismo de estos esteroides.

La determinación de P_4 fue elegida como principal medida de la velocidad de ruptura de la cadena lateral de colesterol. Esta elección se debió a que si bien la conversión de P_5 a P_4 , para medir P_5 puede ser inhibida por cianocetona (Kahnt y

col, 1974) actuando a concentraciones 10^{-4} y 10^{-5} M, éstas simultáneamente inhiben el Cit P450_{SCC} y la C17-20 liasa (Kahnt y col, 1974).

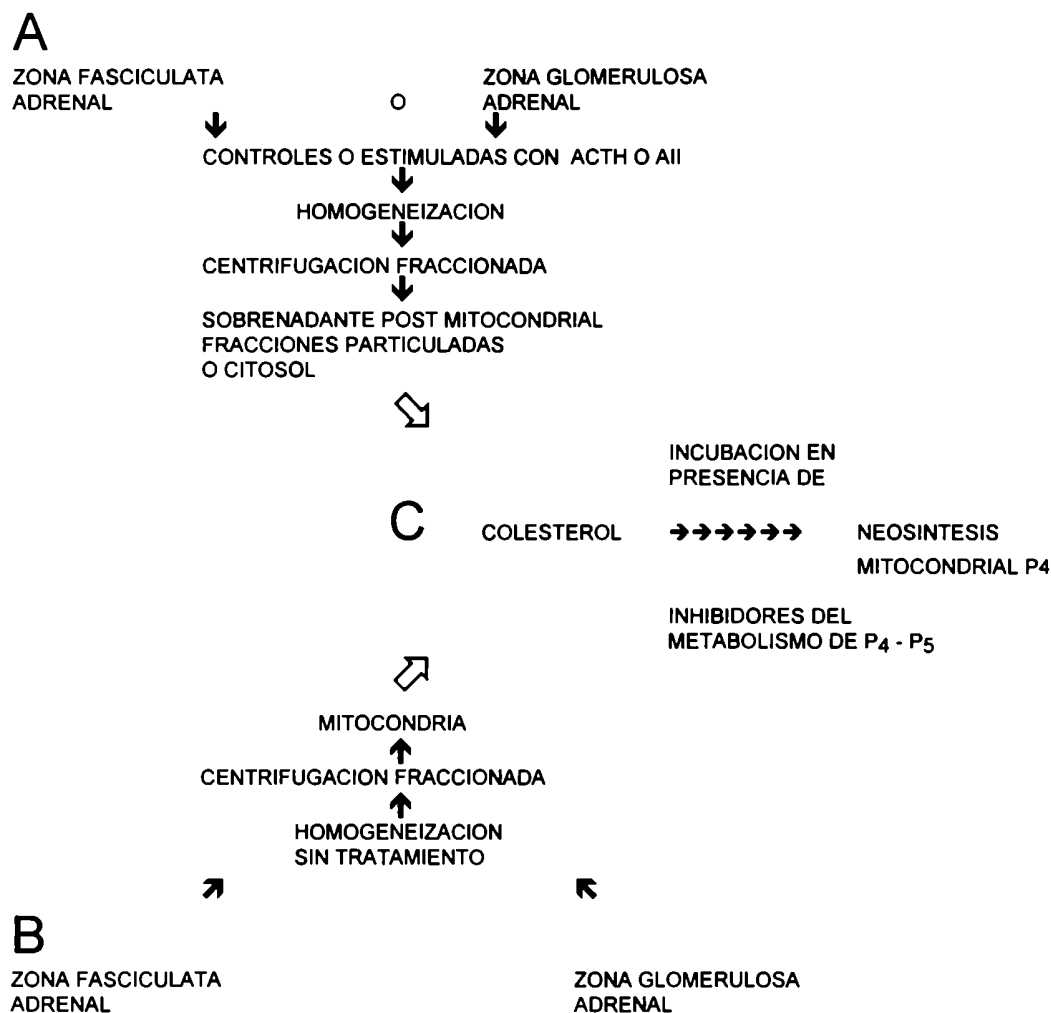
Para inhibir la generación de productos 21-hidroxilados se utiliza el compuesto sulfato de 1- (β - guanidinoetil)-3-(4-piridil) indol (Ba 40.028) (Kahnt y Neher, 1972), el cual inhibe específicamente la 21 hidroxilación de los 17-deoxiesteroideos pero no la de los 17 α - hidroxiesteroideos.

Debido a su habilidad para interferir con los pasos finales en la biosíntesis de todos los corticoesteroides importantes (esto es: cortisol, corticosterona y aldosterona) se utiliza Metopyrona (Kahnt y Neher, 1962) en nuestro ensayo como inhibidor de la 11 β - hidroxilación. La Metopyrona inhibe las 18-, 19- y 16-hidroxilaciones tan fuertemente como la 11 β - hidroxilación (Kahnt y Neher, 1962).

Luego de la realización del ensayo que se describe más abajo, en presencia de P₅ tritiada como sustrato y de 0,27 mM de Metopirona y 1,6 mM de Ba 40.028 como inhibidores de las respectivas hidroxilasas, la realización de una cromatografía en capa delgada permitió observar que la P₅ tritiada fue recuperada principalmente como P₄ (65%), P₅ sin cambios (25%) y solamente muy poco (5%) en la forma de productos polares.

Las incubaciones para medir el efecto de las distintas fracciones subcelulares sobre el paso limitante de la esteroidogénesis (Figura 13) fueron llevadas a cabo en viales de vidrio (180 x 130 mm) siliconados donde fueron colocadas fracciones post-mitocondriales o citosol (con o sin el agregado de fracción microsomal) provenientes de adrenales controles o tratadas, equivalentes a media para la ZF y a una adrenal para la ZG y suplementado con medio A hasta

FIGURA 13: Esquematzación del ensayo de recombinación para la medición de la actividad esteroidogénica de las fracciones subcelulares.



Referencias: A: La ZF o ZG adrenal tratadas o no con ACTH o AII según corresponda fue homogeneizada y sometida a centrifugación fraccionada para aislar las diferentes fracciones.

B: La ZF o la ZG proveniente de animales controles fue homogeneizada y centrifugada para aislar la fracción mitocondrial.

C: Las fracciones subcelulares obtenidas según A fueron recombinadas con las mitocondrias en presencia de inhibidores del metabolismo de P₅ - P₄.

un volumen de 250 μ l. Cuando corresponde los sedimentos pre-mitocondrial y microsomal fueron agregados en cantidades equivalentes a media adrenal para la ZF y una adrenal para la ZG. Los inhibidores de la metabolización de P_4 fueron agregados en un volumen de 350 μ l de medio B (1 volumen de 0,15 M Tris-HCl pH 7,4, 2 volúmenes de medio A, 1 volumen de 0,3 M de KCl y 1 volumen de 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$). Las concentraciones de Metopyrona y Ba 40.028 fueron 60 y 600 μ g respectivamente, por mililitro de mezcla de incubación final. La mezcla fue completada a un volumen final de 700 μ l con el agregado de 100 μ l de la fracción mitocondrial proveniente de adrenales no tratadas o medio A. La mezcla fue entonces incubada a 37°C por 10 minutos con agitación (100 ciclos/minuto).

La incubación se termina por enfriamiento en agua/hielo y por el agregado de 2 ml de metanol-agua (1:1 vol/vol) por tubo, los esteroides fueron extraídos con 1,5 ml de ciclohexano. El agregado de progesterona tritiada a la mezcla demostró que la extracción del esteroide fue mayor que del 90%.

Luego de agitar y centrifugar la fase orgánica superior fue transferida a un tubo de vidrio siliconado de 5 ml, y utilizada para realizar la determinación de P_4 .

Bajo estas condiciones, en la realización del ensayo para ZF se observó un incremento neto en la formación de P_4 cuando el PMTS de adrenales de animales controles fue gradualmente reemplazado por el PMTS de animales tratados con ACTH. Este incremento fue lineal a partir del 25% de PMTS-ACTH dependiente. En los ensayos en que se utilizó PMTS-ACTH dependiente, éste fue capaz de incrementar la síntesis neta de P_4 en mitocondrias controles 10 veces como mínimo en comparación con lo que produce el PMTS control.

III-2: Cálculo para la producción neta de P_4 en el ensayo libre de células.

La formación neta de P_4 fue calculada de la siguiente manera:

1.- los sobrenadantes post-mitocondriales o el citosol se incuban sin el agregado de mitocondrias para determinar el contenido endógeno de estas fracciones.

2.- las mitocondrias se incuban sin el agregado de otra fracción subcelular para determinar su contenido de progesterona.

3.- se suma la cantidad de progesterona obtenida en cada una de estas incubaciones y este valor es sustraído del valor de progesterona obtenido cuando se incuba la mezcla completa.

$P_4 \text{ neta} = P_4 \text{ en la mezcla de incubación completa} - (P_4 \text{ de la incubación sin mitocondrias} + P_4 \text{ contenida en las mitocondrias}).$

SECCION IV: PRODUCCION DE FACTORES ESTEROIDOGENICOS POR ESTIMULACION CON AMP_c EN EL ENSAYO LIBRE DE CELULAS.

IV-1: Descripción de las células Y₁. Obtención de células mutantes.

Producción de factores esteroideogénicos en células Y₁.

Una descripción extensiva del origen y propiedades de la línea celular Y₁ ha sido presentado en la bibliografía (Schimmer, 1985). En resumen, las células Y₁ se originan a partir de tumores adrenales de ratón. Estas células crecen como células epiteliales planas en un cultivo en monocapa, sintetizan y secretan Δ^4 -3-ceto-C₂₁ esteroides a partir de colesterol y acumulan ácido ascórbico y colesterol del medio de cultivo.

La línea celular Y₁ tiene una velocidad de replicación promedio de 30-40 horas, una eficiencia de plaqueo de 4-10% y llega a una densidad de saturación de $2,7 \cdot 10^5$ células/cm². Esta línea celular, en presencia de dosis máximas efectivas de ACTH, produce esteroides a una velocidad de $1,20 \pm 0,24$ ng de esteroides/10⁵ células/minuto; siendo los esteroides producidos en mayor proporción progesterona y 20- α - hidroxiprogesterona.

Cuando son tratadas con ACTH o AMP_c estas células incrementan la velocidad de síntesis de esteroides 4 a 10 veces, dejan de dividirse, adquieren una morfología redondeada y se despegan del frasco de cultivo. Esta capacidad del ACTH y del AMP_c para inhibir el crecimiento de la línea Y₁ y causar su redondeo sentó las bases para la selección de las mutantes resistentes a la hormona y al AMP_c.

La obtención de las líneas celulares mutantes fue realizada por el Dr Bernard

Schimmer. Para ello las células Y_1 fueron tratadas con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en el medio de cultivo. Este tratamiento reduce la eficiencia de plaqueo de las células Y_1 al 30% del control, lo cual se considera efectivo para la inducción de mutaciones (Rae y col, 1979). Las células fueron entonces transferidas a medios de cultivo regulares para permitir la expresión de la mutación y se les permitió crecer de 2 a 6 semanas en presencia de 0,8 mM 8-BrAMP_C. Se aislaron las colonias sobrevivientes y se les permitió crecer en medios sin 8-Br AMP_C.

Las colonias sobrevivientes presentaron dos fenotipos diferentes (Rae y col, 1979). Una clase, las denominadas kin^- resultó ser resistente a los efectos del AMP_C y permaneció como monocapas expandidas, en presencia del nucleótido cíclico. Además, este fenotipo fue totalmente resistente a los efectos inhibitorios sobre el crecimiento que produce el 8-BrAMP_C. Las determinaciones bioquímicas demostraron que las mutaciones en los clones kin^- afectaban a la subunidad reguladora de tipo I de la proteína quinasa AMP_C - dependiente de manera tal que la actividad de unión de AMP_C y la sensibilidad de la enzima a la activación por AMP_C estaban afectadas (Doherty y col, 1982).

El segundo tipo de colonias que sobrevivió a la selección (cyc^-) asumió una morfología redondeada en presencia de 1 mM 8-BrAMP_C pero fue resistente a los efectos de ACTH sobre la forma celular.

Las células de la cepa salvaje o las mutantes fueron homogeneizadas en amortiguador hipotónico, y el homogenato procesado como se describe en la sección II.

IV-2: Producción in vitro de factores esteroideogénicos por estimulación con AMP_c en glándulas adrenales de rata.

Las glándulas adrenales fueron obtenidas a partir de ratas tratadas con dexametasona y procesadas tal cual como se describe en la secciones I y II.

El citosol aislado de glándulas adrenales controles fue incubado con AMP_c 10^{-7} a 10^{-3} M durante 10 minutos a 37°C. Al término de esta incubación, dicho citosol fue ensayado en su capacidad de producir el clivaje de la cadena lateral del colesterol por recombinación con los sedimentos de 800xg, 105.000xg y la fracción mitocondrial tal como se describe en la sección III.

En otros experimentos el citosol fue pre-incubado también con quinasa de proteínas dependiente de AMP_c en una concentración de aproximadamente 150 µg/tubo o con inhibidor de proteína quinasa en una concentración de 50 µg/tubo.

Tanto el AMP_c como la proteína quinasa y el inhibidor fueron disueltos en Medio A sin cambio en el volumen final del ensayo descrito en la sección III.

SECCION V: AISLAMIENTO DE CELULAS ESTEROIDOGENICAS Y DETERMINACION DE ESTEROIDES POST-ESTIMULACION.

V-1: Obtención de células de corteza adrenal. Zona fasciculata y reticularis.

Las glándulas fueron obtenidas como se indica más arriba, de ratas macho mantenidas con dexametasona en el agua de bebida durante las 16 horas previas al sacrificio. La digestión de las adrenales decapsuladas se realizó según las técnicas descritas (Swallow y Sayers, 1969; Neher y Milani, 1978) con algunas modificaciones. Una vez extraídas y decapsuladas, las adrenales fueron cortadas en cuartos y recogidas en amortiguador Krebs Ringer bicarbonato pH 7,4 (KRB) suplementado con glucosa 0,01 M (KRBG) y 0,05 % de seroalbúmina bovina (KRBGA) pero al cual no se le agrega Mg^{++} (KRBGA - Mg^{++}). Posteriormente los cuartos de adrenal fueron transferidos sin el sobrenadante a una célula Amicon de ultrafiltración Modelo 52. El tejido fue lavado dos veces a 37°C con 5 mililitros de KRBGA - Mg^{++} por tres minutos cada vez con agitación y gaseo constante con carbógeno. El líquido de lavado es retirado y el tejido digerido con 0,7 ml / adrenal de una solución 0,1% de tripsina en KRBGA - Mg^{++} durante un período de 15 - 20 minutos con gaseo y agitación constante. El procedimiento se repitió dos veces. Durante cada período, la digestión se ayuda pasando aproximadamente 10 veces la suspensión tisular a través de una pipeta Pasteur.

Los sobrenadantes del tratamiento con tripsina luego de ser pasados a través de una gasa de nylon se recogieron en 0,7 ml / adrenal de una solución 0,1% de inhibidor de tripsina en KRBGA con el agregado de Mg^{++} (KRBGA + Mg^{++}) a temperatura ambiente.

La suspensión celular fue centrifugada por 20 minutos a 500xg a temperatura ambiente. El sobrenadante fue descartado, el sedimento resuspendido en KRBGA + Mg^{++} , recentrifugado y las células nuevamente resuspendidas en 16 ml de KRBGA + Mg^{++} .

El procedimiento produce aproximadamente de 0,8 a $1,0 \cdot 10^5$ células viables/glándula adrenal.

En estas condiciones, estas células producen corticosterona como esteroide primario en respuesta a la estimulación con ACTH con una velocidad de 0,3 ng/minuto/ 10^5 células.

Los contaminantes primarios de estas suspensiones de células adrenales son eritrocitos y leucocitos que constituyen el 15% y el 1% respectivamente de las células totales como se determinó por microscopía óptica.

V-2: Obtención de células intersticiales testiculares.

Se obtuvieron células de Leydig a partir de testículo de rata adulta, por dispersión con colagenasa siguiendo la metodología descrita en bibliografía (Mendelson y col, 1975; Podestá y col, 1978a). Una vez que los testículos fueron decapsulados, se incubaron en tubos de polietileno de 50 ml de capacidad conteniendo medio de cultivo M199 (M199), albúmina de suero bovino 1 mg/ml y colagenasa tipo I 0,25 mg/ml. La incubación fue realizada a $37^{\circ}C$ con una agitación de 100 ciclos por minuto. Luego de 15 minutos de incubación, la reacción se detuvo por el agregado de 40 ml de M199 1 mg/ml de BSA. Se dejan decantar los túbulos seminíferos y el sobrenadante se filtra a través de gasa de nylon y luego se centrifuga por 10 minutos a 120xg. El sedimento fue resuspendido en M199 BSA

1 mg/ml en una dilución tal que proporciona una concentración final de células de 10^6 células/ml.

La viabilidad celular fue medida por exclusión con azul tripan, ésta fue mayor que el 90% y no varió durante el período de incubación.

Para cuantificar la proporción de células de Leydig en la preparación, ésta fue sometida a una tinción para determinar la presencia de Δ^5 -3 β hidroxisteroide deshidrogenasa por una modificación del método de Levy y col (Levy y col, 1959). Un mililitro de la suspensión celular fue incubada con 1 ml NAD^+ (8 mg/ml), 1 ml de azul de nitrotetrazolio (2 mg/ml) y 0,1 de dehidroepiandrosterona (1 mg/ml) a 37°C por 60 minutos bajo atmósfera de carbógeno, con agitación. El esteroide fue omitido en los tubos controles. Luego de la incubación, las células fueron observadas al microscopio y contadas en una cámara de Levy. Aquellas en las cuales se observaban granos densos de color azul fueron consideradas como células de Leydig conteniendo el sistema enzimático Δ^5 -3 β hidroxisteroide deshidrogenasa. Los resultados obtenidos demostraron que este sistema se hallaba presente en aproximadamente entre un 10 y 30 % de la población celular, datos que resultaron acordes con la bibliografía (Dufau, 1988). Un millón de células 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa positivas fueron resuspendidas en 1 ml de M199 1% BSA.

En un experimento control la preparación de células intersticiales obtenidas como se acaba de describir fue purificada por un gradiente de metrizamida (Podestá y col, 1978b). Este procedimiento rinde células de Leydig con más del 90% de pureza, las cuales retienen sus características morfológicas y sus propiedades bioquímicas. La preparación cruda de células de Leydig y de células de Leydig purificadas responden por igual a LH y db-AMPC. Con esta preparación se

realizaron experimentos aislados para atribuir los procesos observados a células de Leydig.

V-3: Incubación de zona fasciculata adrenal y de células de Leydig con inhibidores de la fosfolipasa A_2 y de la lipoxigenasa.

Numerosas drogas disminuyen la velocidad de hidrólisis de la fosfolipasa A_2 . Se ha demostrado (Jain y Berg, 1989) que el bromuro de bromofenacilo (BPB) se une covalentemente a un residuo His-48, ubicado en el sitio activo de la PLA_2 , anulando la actividad catalítica de la enzima. La quinacrina es un agente lipofílico que interfiere con la interfase sustrato-enzima ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la PLA_2 (la alteración de la arquitectura lípido-agua impide que la PLA_2 hidrolice al fosfolípido sustrato).

Para analizar el rol de los metabolitos producidos a partir del AA por acción de la LO sobre los sistemas esteroideogénicos, se utilizaron varios inhibidores de la peroxidación lipídica. Los inhibidores utilizados fueron: el antioxidante sintético ácido nordihidroguayarático (NDGA), el ácido 5,8,11,14 eicosatetraínoico (ETYA), 6,7 dihidroxicumarina (esculetina) y el ácido cafeico. El NDGA ha sido usado como inhibidor de las 5- y 12- LO de mamíferos en muchos tejidos (Hamberg, 1976). El ETYA y la esculetina bloquean tanto la CO como la LO; el primero de ellos se comporta como un análogo estructural del AA e inhibe ambas enzimas con igual potencia (Hamberg y Samuelson, 1974) mientras que la esculetina inhibe preferencialmente tanto la 12- como la 5- LO (Sekiya y col, 1982). El cuarto de los inhibidores utilizados, el ácido cafeico inhibe la LO sin ningún efecto colateral sobre la CO (Kohishara y col, 1983). El ácido cafeico y la esculetina presentan un grupo pirocatecol en su estructura inhibiendo a la LO de una manera no competitiva. El

ácido cafeico inhibe a concentraciones micromolares preferentemente la 5-LO y a dosis diez veces mayores a la 5- y 12-LO

En un primer estudio la ZF obtenida como se describe más arriba fue incubada *in toto* con diferentes concentraciones de los inhibidores de la liberación y metabolismo del ácido araquidónico y la producción de corticosterona fue medida por RIE.

Posteriormente, un mililitro de medio conteniendo 10^5 células adrenales o 10^6 células de Leydig fueron pre-incubadas por 30 minutos en presencia de los inhibidores y luego por 120 o 180 minutos respectivamente con el agregado de la hormona o un análogo del AMP_C, en tubos plásticos a 37°C bajo atmósfera de carbógeno en un incubador con agitación. El inhibidor de la fosfolipasa A₂, bromuro de bromofenacilo y los inhibidores de la lipoxigenasa : NDGA, ETYA, esculetina y el ácido cafeico fueron agregados disueltos en etanol, en tanto que la quinacrina, fue disuelta en agua. En los tubos controles se agrega sólo etanol, la concentración final de éste en todos los tubos fue aproximadamente 0,1 % .

Estudios anteriores (Podestá y col, 1979a) demostraron la existencia de una fosfodiesterasa muy activa en células adrenocorticales de rata y una potenciación de la producción de AMP_C y corticosterona inducida por corticotrofina luego del agregado de 3-isobutil-1-metilxantina (MIX). La inhibición de la fosfodiesterasa fue casi total con una concentración de MIX de 1 mM, concentración a partir de la cual comienza a inhibir la esteroidogénesis debido a su acción inhibitoria sobre la síntesis de proteínas adrenales (Grahame- Smith y col, 1967).

Entonces, luego de los 30 minutos de pre-incubación con los inhibidores de la PLA₂ o la LO, en todos los tubos se agregó MIX 10^{-4} M y según correspondiera se agregó ACTH 10^{-10} M disuelto en una solución 0,1 % de inhibidor de tripsina en

KRBGA + Mg^{++} , LH disuelta en M199 5% BSA, un análogo del AMP_c o medio de incubación.

Todos los experimentos fueron realizados por duplicado o triplicado; finalizada la incubación todos los tubos fueron centrifugados a 500xg durante 10 minutos. Alícuotas del sobrenadante fueron ensayadas para determinar su concentración de corticosterona o testosterona por RIE.

Para realizar el RIE de corticosterona se procedió como se indica más abajo, las diferentes alícuotas fueron llevadas a igual volumen mediante el agregado de KRBGA + Mg^{++} .

SECCION VI: DETERMINACION DE ESTEROIDES POR RADIOINMUNOENSAYO.

VI-1: Radioinmunoensayo de corticosterona.

Para el RIE de corticosterona se siguió la metodología descrita (Podestá y col, 1979a) utilizando distintas alícuotas del sobrenadante de la incubación que en todos los casos se llevaron a igual volumen con KRBGA y entonces a 0,1 ml con solución fosfosalina pH 7,4 (PBS). Para la determinación de corticosterona en suero, los sueros fueron previamente extraídos con diclorometano y distintas alícuotas del extracto fueron evaporadas y resuspendidas en 100 μ l de PBS.

Tanto el trazador como el anticuerpo fueron diluídos en PBS conteniendo 1 mg/ml de gelatina. Las muestras fueron incubadas en presencia de volúmenes iguales (0,1 ml) de trazador (10.000 dpm) y anticuerpo anti-corticosterona durante 50 minutos a 45°C.

Al cabo de dicho período los tubos fueron enfriados en agua - hielo y la hormona libre fue separada de la unida al anticuerpo mediante la incubación con 0,2 ml de carbón activado 0,625% p/vol durante 7 minutos a 4°C y posterior centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos.

Los sobrenadantes fueron trasvasados rápidamente a viales de conteo agregándose 0,5 ml de dioxano y 2,5 ml de mezcla centelleadora Omnifluor para realizar las mediciones en un contador β de centelleo líquido.

VI-2: Radioinmunoensayo de aldosterona.

La aldosterona fue medida por un RIE directo (Bell y col, 1981). Para ello distintas alícuotas del sobrenadante de incubación fueron diluídas en solución

fosfosalina y fueron incubadas durante 50 minutos a 45°C, utilizando un anticuerpo producido en oveja contra un conjugado de aldosterona-BSA y 10.000 dpm de [1,2,6,7 ³H] aldosterona como trazador.

Finalizada la incubación se procedió de igual manera que para el RIE de corticosterona.

VI-3: Radioinmunoensayo de P₄.

Una porción del extracto de ciclohexano fue diluída 1:3 con etanol absoluto y alícuotas de 5 a 50 µl de esta solución fueron transferidas a tubos de vidrio, llevadas a igual volumen y evaporadas. Para llevar a volumen las distintas alícuotas se utilizó un extracto blanco, el cual se prepara incubando una mezcla conteniendo todos los elementos con excepción de las fracciones subcelulares de igual manera que para la realización del ensayo y extrayendo luego con el mismo volumen de ciclohexano con que son extraídas las muestras. Este extracto de ciclohexano es el que se utiliza para llevar a volumen.

Para calcular exactamente la cantidad de P₄ formada en el ensayo, la curva de calibración fue realizada utilizando una solución estándar de P₄ tratada del mismo modo que la P₄ producida en el ensayo y llevada al mismo volumen que la muestra con extracto blanco.

Una vez ocurrida la evaporación, la progesterona es resuspendida en PBS, agitada en vortex durante 30 segundos, colocada en un baño a 37°C durante dos horas y agitada nuevamente en un vortex.

Esta solución es incubada durante 50 min. a 45 °C con 100 µl de progesterona radiactiva (10.000 dpm) y 100 µl de anticuerpo anti-progesterona.

Al cabo de dicho período los tubos fueron enfriados en agua-hielo y se los procesó de igual manera que para el RIE de corticosterona.

V-4: Radioinmunoensayo de testosterona.

Las determinaciones de testosterona en los medios de incubación fueron realizadas en base a la metodología descrita en bibliografía (Dufau y col, 1972) con modificaciones según el siguiente protocolo: alícuotas del sobrenadante de incubación fueron diluidas en solución fosfosalina y fracciones de hasta 100 μ l fueron incubadas con 0,1 ml de testosterona radiactiva (10.000 dpm) y 0,1 ml de anticuerpo anti-testosterona, durante 50 minutos a 45 °C.

Finalizada la incubación se procedió de igual manera que para el RIE de corticosterona.

SECCION VI: PRODUCCION DE ACIDO ARAQUIDONICO POR CELULAS DE ZF DE CORTEZA ADRENAL Y CELULAS DE LEYDIG.

VI-1: Incorporación de AA radiactivo.

Las células adrenocorticales fueron incubadas con 1,5 μCi de (5,6,8,9,11,14,15 -³H) ácido araquidónico (volumen final: 2 ml) en KRBGA + Mg conteniendo en cada caso una concentración 10^{-6} M de ácido araquidónico frío y una concentración 4 veces menor de BSA libre de ácidos grasos.

Luego de 5 horas de incubación a 37 °C bajo atmósfera de carbógeno las células fueron centrifugadas a 500xg por 20 minutos y el sobrenadante fue descartado. Este procedimiento se repitió una vez más; las células fueron resuspendidas en KRBGA + Mg⁺⁺ (10^5 células adrenales/ml) conteniendo 0,5% BSA, expuestas a 10^{-10} M de ACTH o medio según corresponda e incubadas durante 120 minutos, sin nuevo agregado de AA radiactivo.

Las células se centrifugaron a 500xg, se resuspendieron en 0,27 M manitol - 10 mM Tris pH 7,4 y se sonicaron por 30 segundos. Sobre esta preparación se procedió a la extracción de lípidos.

VI-2: Extracción y cromatografía de lípidos.

El procedimiento de extracción de lípidos se realizó de la siguiente manera: las muestras (0,5 ml) fueron extraídas con 3 ml de éter etílico acidificado con ácido cítrico 1 M. La fase orgánica fue entonces recogida con una pipeta Pasteur, secada bajo nitrógeno a 25 °C, resuspendida en cloroformo: metanol (9:1 vol/vol) y tomada para cromatografía en capa delgada, sobre sílica gel usando hexano: éter etílico: ácido cítrico 1M (60:40:1 vol/vol) como solvente de desarrollo y en la oscuridad. A

ambos lados de cada muestra se sembró una alícuota de una solución en cloroformo: metanol (9:1 vol/vol) de un estándar puro de AA que fue teñida con vapores de yodo y utilizada como patrón de comparación. El AA (R_f : 0,4) fue eluido del cromatograma con 3 ml de éter etílico y contado en un contador de centelleo líquido.

VI-3: Extracción de fosfolípidos.

La extracción y cromatografía de fosfolípidos fue realizada según la técnica de Garbus (Garbus y col, 1963) con modificaciones según el siguiente protocolo: a la suspensión de células sonificadas (500 μ l) se le agregó 3 ml de metanol: cloroformo (2:1), se agitó vigorosamente y se dejó durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido dicho período se agregó 1 ml de cloroformo y 1 ml de KCl en amortiguador fosfato 0,5 M y se centrifugó durante 5 min. a 2.000 rpm, extrayéndose con pipeta Pasteur la fase orgánica inferior que contiene los fosfolípidos.

Se evaporó el solvente orgánico bajo atmósfera de nitrógeno y se prepararon las muestras para proceder a la cromatografía.

VI-4: Cromatografía de fosfolípidos.

Las muestras disueltas en cloroformo fueron sometidas a cromatografía en capa delgada en placas de sílica gel F 254, en la oscuridad.

La fase móvil para la primera corrida fue CHCl_3 : CH_3OH : NH_3 : H_2O (70:35:3,5:1,5) y para la segunda CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH : H_2O (80:10:2:0,75).

A ambos lados de cada muestra se sembraron estándares de fosfolípidos: fosfatidilserina, L - α - fosfatidilcolina (PC) , fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y lisofosfatidilcolina (LPC).

SECCION VII: ANALISIS ESTADISTICO

Las diferencias estadísticas se analizaron por el test t de Student en el caso de dos grupos y por análisis de varianza y test de Duncan en el caso de más de dos grupos (Li, 1964).

Capítulo III:

RESULTADOS

SECCION I: PRODUCCION DE ESTEROIDES A TRAVES DE CAMINOS DEPENDIENTES E INDEPENDIENTES DEL AMP_C.

I-1: Introducción.

Estudios previos realizados utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor de LH demostraron que la información para generar una función hormonal específica reside en el receptor y no en la hormona (Podestá y col, 1983). Estudios que se realizaron posteriormente utilizando híbridos producidos por electrofusión entre células adrenales y células de Leydig (Podestá y col, 1984) demostraron que la señal generada en la membrana plasmática no sería específica para la célula que porta el receptor, ya que los híbridos Leydig - adrenal pueden producir testosterona y corticosterona por activación del receptor de LH o ACTH. Como ambas hormonas utilizan al AMP_C como segundo mensajero, esta podría ser la razón lógica de la activación heteróloga de la síntesis de esteroides.

La regulación de la síntesis de aldosterona en la zona glomerulosa de la corteza adrenal es única en el sentido que está controlada por distintos factores que ejercen sus acciones a través de algunos de los sistemas de transducción de mensajes conocidos. Los mecanismos utilizados incluyen a) formación de AMP_C, b) regulación de los niveles de Ca⁺⁺ citosólico libre (y activación de la PKC) a través del recambio del fosfatidilinositol, c) modificación de canales iónicos y d) modificación del potencial de membrana. Cualquiera sea el sistema de transducción de mensajes generado en la membrana plasmática todos estimulan el paso limitante de la síntesis de esteroides, esto es la conversión de colesterol en pregnenolona, localizada a nivel mitocondrial.

Es por ello que los primeros experimentos realizados tuvieron como fin determinar si la mitocondria, como blanco común de estímulos diferentes, responde a un intermediario común o es receptor de varios metabolitos surgidos de la acción de los diferentes sistemas de transducción. Para lograr tal objetivo se deberían recombinar mitocondrias con estímulos heterólogos, es decir, por ejemplo recombinar mitocondrias de ZF con factores esteroidogénicos aislados de ZG y estudiar la respuesta a los mismos.

Se ha descrito un ensayo de recombinación *in vitro* (Neher y col, 1982) que potencialmente puede brindar las condiciones para estudiar la estimulación heteróloga. En este ensayo, la zona fasciculata de glándulas adrenales controles y estimuladas con ACTH son sometidas a fraccionamiento subcelular. La recombinación del sobrenadante post-mitocondrial, proveniente de adrenales estimuladas, con mitocondrias de glándulas adrenales de animales sin tratamiento, produce un incremento en la síntesis *de novo* de esteroides activando la conversión de colesterol en pregnenolona en mitocondrias aisladas de glándulas controles. Experimentos realizados utilizando este ensayo (Neher y col, 1982) demostraron la presencia de varios factores esteroidogénicos en distintos compartimentos subcelulares, que actúan sinérgicamente para estimular la síntesis *de novo* de P_4 .

Para poder realizar los experimentos de recombinación heteróloga fue necesario primero constatar la posibilidad de realizar el ensayo de recombinación para factores esteroidogénicos aislados a partir de zona glomerulosa estimulada con ACTH o AII. Para ello, la ZG fue estimulada con ACTH, y sometida a fraccionamiento subcelular para aislar el sobrenadante post-mitocondrial. Los resultados de la Tabla I demuestran que la estimulación de la ZG adrenal con

TABLA I: Producción neta de progesterona por mitocondrias aisladas de zona glomerulosa.

	Neosíntesis de P₄ (ng/adrenal)
PMTS	2,44 ± 0,13
PMTS ACTH	30,20 ± 0,72*

El sobrenadante post-mitocondrial obtenido de ZG de adrenales no estimuladas (PMTS) o estimuladas *in vivo* con ACTH (PMTS ACTH) fue incubado en presencia de mitocondrias provenientes de ZG no tratada. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3) *:p< 0,0001.

ACTH produce factores esteroideogénicos ACTH-dependientes que son capaces de estimular *in vitro* la conversión de colesterol en P_5 en mitocondrias aisladas de ZG de adrenales de animales controles. La producción de P_4 por la recombinación de fracciones subcelulares es mayor que el contenido de P_4 en mitocondrias aisladas de adrenales de animales tratados con ACTH (aproximadamente 15 ng/adrenal).

Luego se procedió a realizar el ensayo de recombinación en ZG estimulada con All. En dicha zona la All es capaz de estimular *in vitro* la síntesis de aldosterona por células de ZG adrenal. La ZG de la corteza adrenal fue incubada *in toto* en amortiguador KRBGA de bajo contenido en potasio y en presencia o ausencia de All 10^{-7} M como se describe en materiales y métodos. Para evaluar la respuesta celular a esta hormona, sobre distintas alícuotas del sobrenadante de la incubación se realizó el RIE de aldosterona. Los valores obtenidos expresados en ng aldosterona / incubación fueron: $1,25 \pm 0,50$ para el control versus $3,90 \pm 0,10$ para All (media \pm DS, $n=3$, $p < 0,001$). De la observación de estos resultados puede inferirse que en las incubaciones de ZG *in toto* All estimula la producción de aldosterona 3 veces con respecto a los valores obtenidos en su ausencia.

Estudios previos reportan que All estimula la producción de aldosterona no sólo activando el pasaje de colesterol a pregnenolona sino que también activa un paso posterior entre 11 - desoxicorticosterona o corticosterona y aldosterona (Muller, 1971; Tait y col, 1975; Bing, 1977; Mc Kenna y col, 1978; Aguilera y Catt, 1979). Como aquí se estudia la capacidad de los factores esteroideogénicos presentes en el citosol para estimular el clivaje de la cadena lateral del colesterol, se consideró necesario estudiar el efecto de All al tiempo y dosis utilizadas directamente sobre el paso limitante de la síntesis de esteroides. Para ello, a partir de ZG incubada *in vitro* con All se aislaron las mitocondrias y se estudió su

producción de P_4 sin el agregado de ninguna otra fracción subcelular. El incremento en la neosíntesis de P_4 observado en la tabla II demuestra, que por estimulación *in vitro* se puede producir aldosterona a expensas de la síntesis *de novo* de esteroides.

Una vez observado que es posible estimular la síntesis de P_4 *in vitro* por acción de AII en ZG de la corteza adrenal, se procedió a desarrollar la metodología para producir la activación mitocondrial por acción de factores esteroidogénicos generados luego de tratar las células de ZG con AII. Para ello se aislaron los sobrenadantes post-mitocondriales de células de ZG de glándulas controles (PMTS) o estimuladas con AII 10^{-7} M (PMTS AII) y estas fracciones fueron incubadas en presencia de mitocondrias de ZG de adrenales no tratadas, tal como se describe en materiales y métodos.

La Tabla III muestra que el PMTS AII produce un incremento de aproximadamente 6 veces en la producción de P_4 comparado con la P_4 producida por un PMTS obtenido de glándulas adrenales sin tratamiento alguno. En base a estos datos se podría concluir que AII genera *in vitro* una serie de factores que son capaces de producir un incremento en la biosíntesis de P_4 cuando son recombinados en el ensayo libre de células.

Teniendo toda la metodología puesta a punto y al ser viable la estimulación de la síntesis mitocondrial de progesterona en un sistema libre de células por factores esteroidogénicos aislados tanto de ZF estimulada con ACTH o de ZG tratada con AII, se procedió a realizar los experimentos de recombinación heteróloga.

TABLA II: Contenido de progesterona en mitocondrias aisladas de zona glomerulosa.

Fuente de mitocondrias	Contenido de P ₄ (ng/adrenal)
ZG sin tratamiento.	1,35 ± 0,16
ZG incubada con All.	5,79 ± 0,31*

Se obtuvo la ZG y ésta fue incubada en amortiguador KRBGA de bajo contenido en potasio con o sin el agregado de 10^{-7} M de All. Al término de la incubación se obtuvo la fracción mitocondrial y se procedió a realizar el ensayo de recombinación descrito en materiales y métodos, en ausencia de cualquier otra fracción subcelular. El contenido de P₄ fue determinado por RIE luego de la extracción de P₄ tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3) *:p< 0,005.

TABLA III: Producción neta de progesterona por mitocondrias aisladas de zona glomerulosa.

	Neosíntesis de P₄ (ng/adrenal)
PMTS	2,00 ± 0,11
PMTS AII	12,24 ± 0,14*

El sobrenadante post-mitocondrial aislado de ZG adrenal incubada con KRBGA (PMTS), o con AII (PMTS AII) fue incubado en presencia de mitocondrias provenientes de ZG de glándulas adrenales no estimuladas como se describe en métodos. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como fue descripto. (media ± DS n=3) *:p < 0,0001.

I-2: Recombinación heteróloga de factores esteroidogénicos producidos en ZF y ZG de la corteza adrenal.

Con el objeto de evaluar la existencia de un intermediario común en el mecanismo de acción de ACTH y All se procedió a realizar una recombinación heteróloga es decir la estimulación de las mitocondrias sin tratar de una de las zonas de la corteza adrenal por factores esteroidogénicos generados en la otra.

El primer tipo de ensayo realizado consistió en aislar factores esteroidogénicos producidos en ZF por el tratamiento *in vivo* con ACTH y recombinarlos con mitocondrias de ZG provenientes de adrenales no tratadas. Los resultados se muestran en la Tabla IV. Como se puede observar en dicha tabla, factores esteroidogénicos provenientes de ZF tratada con ACTH son capaces de activar el paso limitante de la esteroidogénesis, en mitocondrias no tratadas de ZG, 8 veces con respecto a factores provenientes de ZF control. Luego, se procedió a aislar factores esteroidogénicos producidos *in vivo* en ZG por ACTH y recombinarlos con mitocondrias no tratadas de ZF. Los resultados de estos experimentos se muestran también en la Tabla IV, en la cual se puede observar un incremento de 9 veces en la producción de progesterona por el sobrenadante post-mitocondrial aislado de adrenales tratadas con respecto al aislado de adrenales controles.

Es interesante observar que los factores esteroidogénicos producidos por ACTH tanto en la ZF como en la ZG tienen igual capacidad para estimular la síntesis de progesterona ya sea en mitocondrias homólogas o heterólogas,

TABLA IV: Producción neta de progesterona por mitocondrias aisladas de ZF y ZG. Recombinación heteróloga.

	Neosíntesis de P₄ (ng/adrenal)
Fuente de PMTS	Fuente de mitocondrias: ZG
PMTSF	2,48 ± 0,85
PMTSF ACTH	20,58 ± 0,21*
	Fuente de mitocondrias: ZF
PMTSG	3,10 ± 0,35
PMTSG ACTH	26,00 ± 1,05*

El sobrenadante post-mitocondrial obtenido de ZF (PMTSF) o ZG (PMTSG) proveniente de adrenales sin tratamiento, o tratados *in vivo* con ACTH, fue incubado según correspondiera con mitocondrias aisladas de ZF o ZG obtenida de animales sin tratamiento. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída como se describe en métodos. (media ± DS, n=3).*:p<0,0001.

conociéndose que la cantidad de mitocondrias agregadas en el ensayo no es limitante para producir la estimulación (Neher y col, 1982).

Con estos experimentos se pudo demostrar que factores esteroideogénicos dependientes de ACTH generados en una de las zonas de la corteza adrenal son capaces de producir estimulación en la otra. Esto podría deberse aún a que en ambas zonas ACTH utiliza como sistema de transducción la activación de la adenilato ciclasa con la consiguiente producción de AMP_C . Es por ello que el paso siguiente fue estudiar la recombinación heteróloga usando como factores esteroideogénicos aquellos producidos por AII en ZG teniendo en cuenta que dicha hormona actúa por caminos independientes del AMP_C (Bell y col, 1981) y usar mitocondrias de ZF que sólo reconocerían la cascada de eventos producida por ACTH vía AMP_C . Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V. La estimulación de la ZG con AII promueve la formación intracelular de factores esteroideogénicos que son capaces de estimular 5 veces la síntesis de progesterona en mitocondrias aisladas de ZF.

Debido al hecho que ACTH y AII poseen dos sistemas de transducción de señales intracelulares diferentes y a que las mitocondrias aisladas de ZF pueden reconocer factores esteroideogénicos ACTH- AMP_C dependientes y factores AII dependientes - AMP_C independientes, sería razonable postular la presencia de un intermediario común a pesar del diferente sistema de transducción generado en la membrana plasmática.

TABLA V: Producción neta de progesterona por mitocondrias aisladas de ZF estimuladas con factores esteroidogénicos producidos en ZG por AII.

Tratamiento	Neosíntesis de P ₄ (ng/adrenal)
PMTS	2,20 ± 0,10
PMTS AII	10,98 ± 0,28*

El sobrenadante post-mitocondrial aislado de ZG de adrenales no estimuladas (PMTS), estimuladas *in vitro* con AII 10⁻⁷ M (PMTS AII) fue incubado en presencia de mitocondrias provenientes de ZF de animales controles. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=4). *:p<0,0001.

SECCION II: METABOLITO COMUN ESTIMULADOR DE LA ESTEROIDOGENESIS MITOCONDRIAL EN DIFERENTES SISTEMAS.

II-1: Introducción.

Los estudios posteriores estuvieron destinados a identificar al posible intermediario común en la acción de AII y ACTH.

Un candidato a considerar fue el Ca^{++} ya que como se indicó anteriormente, a pesar de las diferencias en sus mecanismos de acción, ACTH, AII y potasio inducen un efecto cualitativamente similar: incrementan el influjo de Ca^{++} . Como ya se ha descrito, en el mecanismo de acción de ACTH, ya sea en ZF o ZG, el Ca^{++} parece interactuar con el sistema mensajero de AMP_c . Se ha demostrado que el complejo Ca^{++} /calmodulina es necesario para la activación mediada por receptor de la adenilato ciclasa (Papadopoulos y col., 1990) y que también está involucrado en algún paso distal a la producción de AMP_c (Podestá y col, 1979a; Hall y col. 1981). Sin embargo, un sobrenadante post-mitocondrial obtenido de células de ZF luego de la activación con ACTH, puede producir un incremento en la síntesis de P_4 aún cuando esté incubado en presencia de EGTA 1 mM (Neher y col, 1982).

La estimulación de la síntesis de esteroides inducida por AII en células de ZG es inhibida por agentes quelantes de Ca^{++} (Fakunding y col, 1979; Fakunding y col, 1980; Elliott y col, 1985). Sin embargo, los resultados obtenidos en ZF con ACTH se repitieron (Tabla VI) cuando el PMTS fue aislado a partir de ZG estimulada *in vitro* con AII y pre-incubado en presencia de EGTA 1mM o EDTA 1mM, concentraciones que han probado ser efectivas para inhibir la síntesis de

TABLA VI: Efecto de los quelantes de calcio sobre la estimulación de la síntesis de progesterona.

Quelante	Fracción subcelular	Neosíntesis de P ₄ (ng/adrenal)
---	PMTS	2,70 ± 0,18
	PMTS All	11,30 ± 0,33*
EDTA 1mM	PMTS	3,00 ± 0,20
	PMTS All	13,70 ± 0,40*
EGTA 1mM	PMTS	3,70 ± 0,50
	PMTS All	10,40 ± 0,50*

Se aisló el PMTS de ZG de adrenales controles y tratadas *in vitro* con All 10^{-7} M. Previamente a la realización del ensayo de recombinación el PMTS fue incubado durante 10 min. en presencia de EDTA 1mM, EGTA 1mM o Medio A. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída, tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3),*: p < 0,0001, para cada PMTS All con respecto a su respectivo control.

esteroides en células de ZG (Elliott y col, 1985). Si bien existen diferencias en la bibliografía con respecto a los valores en la concentración de calcio intracelular alcanzados después del tratamiento con All, la concentración de EGTA y EDTA utilizada es suficientemente alta para quelar todo el calcio citosólico aun para los valores mas altos que se describen. Por ejemplo, para una concentración de Ca^{++} intracelular entre 100 y 1000 nM, en las condiciones en que se realiza el ensayo de recombinación, la concentración de calcio libre calculada en base a las constantes de afinidad para el EDTA y EGTA es igual a cero.

Estos resultados sugerirían que el activador común de la mitocondria no es el Ca^{++} por sí mismo sino algún producto generado luego de su movilización intracelular.

Dado que All actúa a través del recambio del fosfatidilinositol también se consideró la acción de ACTH sobre la hidrólisis de polifosfoinosítidos y la producción de inositolfosfato.

Estudios de diversos laboratorios (Kojima y col, 1985b; Iida y col, 1986) demuestran que ACTH en las mismas dosis que promueve la síntesis de esteroides, no activa la fosfolipasa C específica responsable de la hidrólisis del PIP_2 y PIP ; aunque en algunas publicaciones (Kojima y col, 1985b) se describe una muy pequeña y transitoria disminución en el contenido de PIP_2 y PIP sin el concomitante incremento de IP_2 o IP_3 . La explicación que parece más conveniente para interpretar este efecto es que la disminución en los polifosfoinosítoles está mediada por un aumento en el Ca^{++} citosólico y reflejaría la activación de una fosfolipasa A_2 como fue descripto por Schrey y Rubin (Schrey y Rubin, 1979) en células adrenales y por Rittenhouse (Rittenhouse y Horne, 1984) en plaquetas.

Como ya fue detallado, el incremento en la ZG de la síntesis de aldosterona producido por All puede ser inhibido por sustancias que bloquean la liberación de ácido araquidónico a partir de distintos fosfolípidos (Kojima y col, 1985e).

Estos datos tomados en conjunto nos llevaron a pensar que el AA podría ser el intermediario común en la síntesis de esteroides por All y ACTH y esto permitiría identificar cuáles son los pasos que relacionan, en el mecanismo de acción de ACTH, la fosforilación mediada por AMPc y la síntesis de esteroides. Para estudiar dicha hipótesis se estudió la acción de inhibidores de la liberación de AA sobre la estimulación de la síntesis de esteroides por ACTH en células aisladas de ZF de corteza adrenal.

II-2: Estudio del rol del ácido araquidónico y sus metabolitos en la esteroidogénesis.

Se analizaron los efectos del bromuro de bromofenacilo, un inhibidor de la PLA_2 (Volwerk y col, 1974; Roberts y col, 1977), sobre la secreción de corticosterona mediada por ACTH sobre la ZF *in toto*. Para ello la ZF de la glándula adrenal fue incubada durante 30 minutos en presencia o ausencia de BPB 5 μ M. Al término de este período se adicionó ACTH 10^{-10} M y la incubación se prosiguió por 120 minutos. La corticosterona fue determinada en el medio de incubación por RIE obteniéndose los siguientes resultados: (ng corticosterona / adrenal (media \pm DS n=2) Control: $11,7 \pm 1,3$, ACTH: $33,0 \pm 3,0$, BPB: $9,5 \pm 0,5$, BPB + ACTH: $9,6 \pm 1,0$ ($p < 0,05$). De la determinación de corticosterona en el medio de incubación se puede deducir que el BPB inhibe la capacidad de ACTH de activar la síntesis y secreción de esteroides.

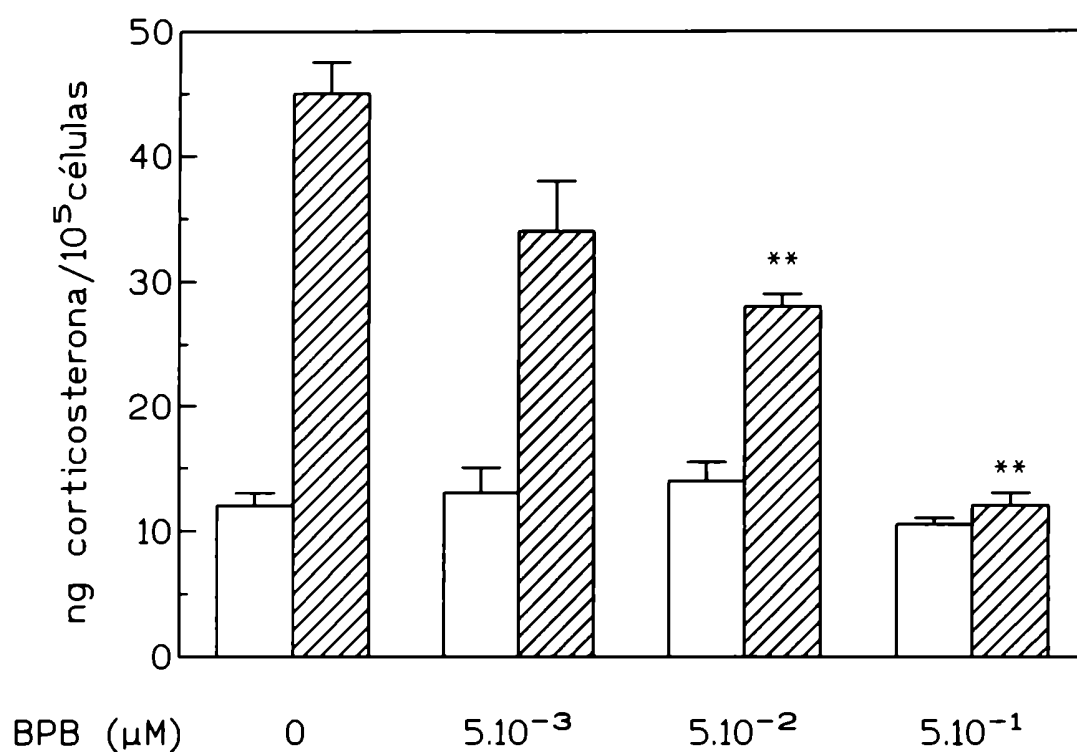
Para corroborar este resultado en un sistema más sensible, células aisladas de ZF de corteza adrenal fueron incubadas en presencia de varias dosis del inhibidor como puede observarse en la figura 14. En células aisladas de ZF adrenal BPB inhibe la producción de corticosterona estimulada por ACTH de una manera dosis dependiente, con una DI_{50} : $6,2 \cdot 10^{-3} \mu M$ sin afectar la producción basal de esteroides, y concentraciones tan pequeñas como $0,5 \mu M$ inhiben casi completamente la estimulación.

Con el objeto de estudiar si el efecto observado de BPB era particular para las acciones de ACTH sobre células aisladas de la corteza adrenal o eran extensivos a otro sistemas productores de esteroides, se estudiaron los efectos de BPB en células de Leydig aisladas sobre la síntesis de testosterona inducida por LH.

En células de Leydig (fig. 15) se observa que luego de la pre-incubación de 30 minutos, BPB en las dosis utilizadas no tiene efecto sobre la producción basal de esteroides y a una concentración de $0,1 \mu M$ inhibe completamente la producción de testosterona estimulada por LH. Existe un reporte que describe que la pre-incubación de células de Leydig con dosis de BPB un orden de magnitud mayor que la descripta más arriba inhiben la producción de esteroides estimulada por 22-R-OH colesterol (Abayasekara y col, 1990). Sin embargo, cuando las células de Leydig fueron pre-incubadas con $0,1 \mu M$ BPB y luego incubadas por 180 min. con 22-R-OH colesterol $5 \mu M$ no pudo observarse ningún efecto inhibitorio de BPB. (ng corticosterona / 10^6 células n=2) Control: $14,4 \pm 1,8$; 22-R-OH colesterol: $61,8 \pm 7,3$; BPB + 22-R-OH colesterol: $51,5 \pm 7,9$.

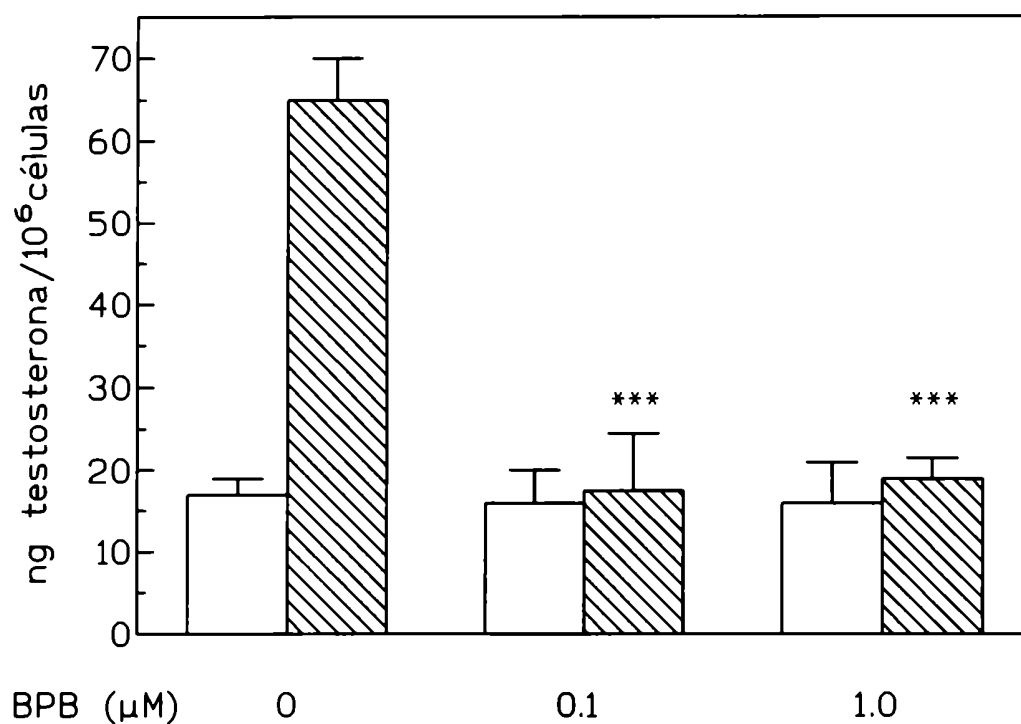
Adicionalmente, las células de Leydig fueron incubadas con quinacrina, otro inhibidor de la PLA_2 . La figura 16 muestra los resultados obtenidos en las

FIGURA 14: Efecto de BPB sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en células de ZF de corteza adrenal.



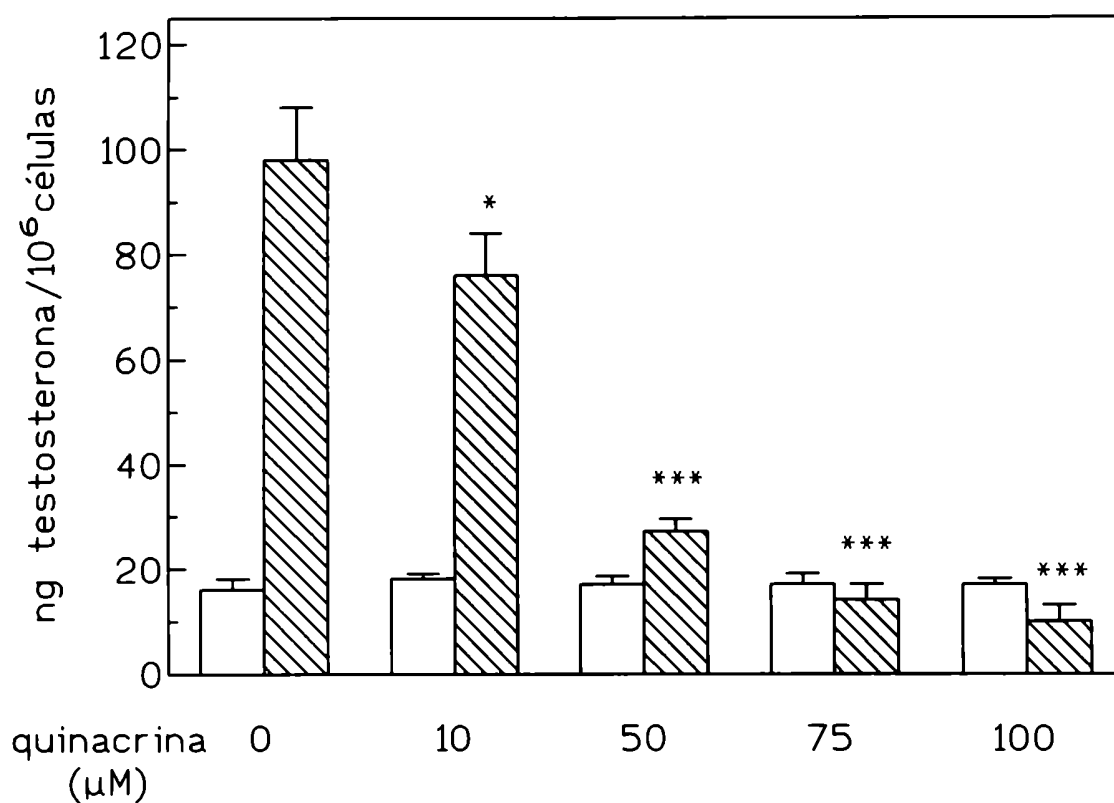
Células de ZF aisladas (10^5 células/ml) fueron incubadas por 30 min. en presencia de BPB o vehículo y luego durante 120 min. en presencia de ACTH 10^{-10} M (barras rayadas), o en su ausencia (barras lisas). La producción de corticosterona en el medio de incubación fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3) *:p < 0,01.

FIGURA 15 Efecto de BPB sobre la producción de testosterona estimulada por LH en células de Leydig.



Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. en presencia de BPB o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de LH 0,75 mUI/ml (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3) *: $p < 0,001$.

FIGURA 16: Efecto de quinacrina sobre la producción de testosterona estimulada por LH en células de Leydig aisladas.



Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de quinacrina o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de LH 0,75 mUI/ml (barras rayadas), o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$) * $p < 0,5$; *** $p < 0,001$.

incubaciones utilizando quinacrina. En esta figura puede observarse que el inhibidor no afecta la producción basal de testosterona y que a una dosis de 75 μM bloquea completamente el efecto estimulador de la hormona, presentando una DI_{50} : 16 μM . Aún a las dosis mayores utilizadas, quinacrina no tuvo efecto sobre la viabilidad celular.

Estos resultados sugieren que la liberación de AA podría ser un evento común para la estimulación de la síntesis de esteroides luego de la activación por ACTH y LH de sus respectivos receptores.

Para que el AA pueda ser considerado un intermediario en la esteroidogénesis estimulada por hormonas debería cumplir los siguientes requisitos:

- a) Inhibidores de la liberación del intermediario deben inhibir la respuesta final.
- b) Si el intermediario es metabolizado, inhibidores del metabolismo deberían bloquear la respuesta biológica.
- c) Debería ser posible imitar la respuesta hormonal agregando el intermediario exógenamente.
- d) El agregado exógeno del intermediario debería anular la inhibición producida por los inhibidores de su liberación.
- e) La hormona debería producir un incremento en los niveles intracelulares del intermediario. Estos incrementos deberían observarse a concentraciones fisiológicas de la hormona y preceder o al menos no seguir temporalmente a la respuesta biológica para cada hormona en particular.

Como se describió anteriormente, la pre-incubación con BPB y quinacrina bloquea la respuesta esteroidogénica a la hormona en células adrenales y de Leydig cumpliéndose el postulado a.

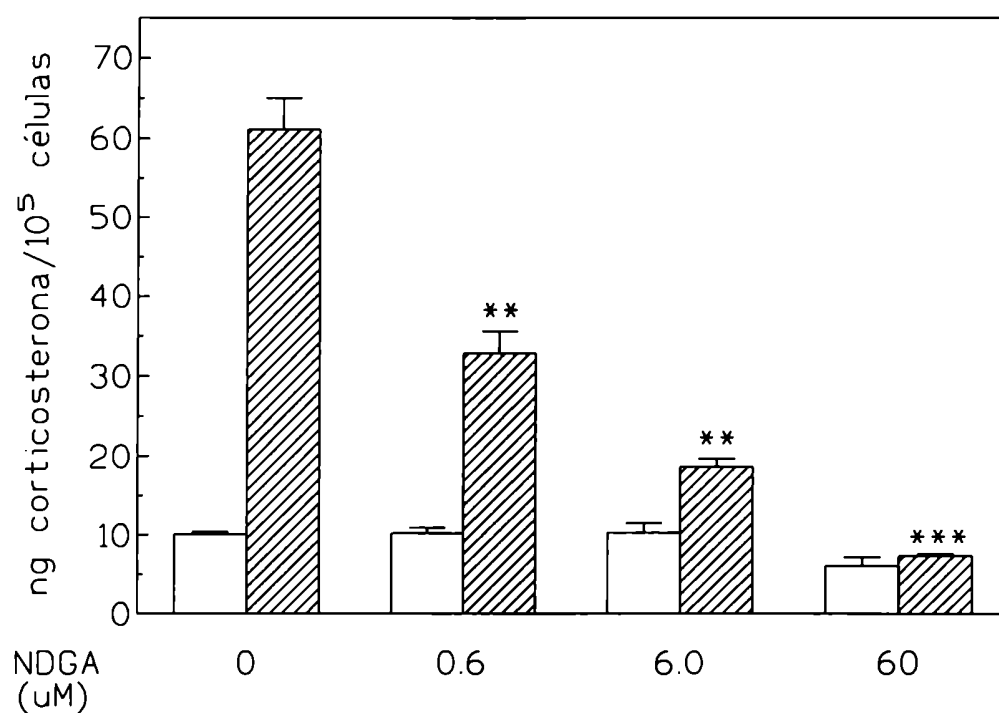
Con respecto al postulado b, como ya se describió en la introducción, el AA es enzimáticamente oxidado en muchos tipos celulares a través de tres vías principales: la de las cicloxigenasas, la de las lipoxigenasas y una epoxigenasa dependiente del citocromo P450 (Needleman y col, 1986).

Estudios previos realizados en células de ZF han demostrado que el ACTH y el AMP_c incrementan la producción de prostaglandinas en adrenal de rata (Chanderbhan y col, 1979), pero esta estimulación no se correlaciona temporalmente con la esteroidogénesis aguda y además la incubación de células adrenales con dosis crecientes de indometacina, un inhibidor de la CO, bloquea la formación de prostaglandinas en una manera dosis dependiente sin afectar la producción de esteroides estimulada por ACTH (Hirai y col, 1985). El mismo tipo de resultados puede observarse (Dix y col, 1984) luego de la incubación con indometacina de células de Leydig aisladas. Estos resultados sugerirían que la vía de las CO no está involucrada en la estimulación aguda de la esteroidogénesis.

Se evaluaron los efectos de el ACTH y la LH sobre la producción de productos lipoxigenados utilizando varios inhibidores de la LO estructuralmente no relacionados como son el NDGA, el ETYA, el ácido cafeico y la esculetina (Hamberg y Samuelson, 1974; Hamberg, 1976; Sekiya y col, 1982; Kohishara y col, 1983).

La ZF de la glándula adrenal fue incubada con NDGA previamente al agregado de la hormona y la corticosterona producida fue medida por RIE demostrándose que el NDGA bloquea la acción hormonal de una manera dosis dependiente. Este resultado fue reproducido utilizando células aisladas de ZF (fig. 17) y células de Leydig (fig. 18). En las células de ZF (fig. 17) puede observarse que

FIGURA 17: Efecto de NDGA sobre la producción de corticosterona estimulada por ACTH en células aisladas de ZF de corteza adrenal.



Células aisladas de ZF de corteza adrenal (10^5 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de NDGA o vehículo y luego durante 120 min. en presencia de ACTH 10^{-10} M (barras rayadas), o en su ausencia (barras lisas). La producción de corticosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

NDGA hasta 60 μM no afecta la producción basal de las células y bloquea la acción hormonal con una DI_{50} : 0,4 μM .

Los mismos resultados se obtuvieron en células de Leydig (fig. 18) donde NDGA inhibe la esteroidogénesis estimulada por LH con una DI_{50} de 2,4 μM .

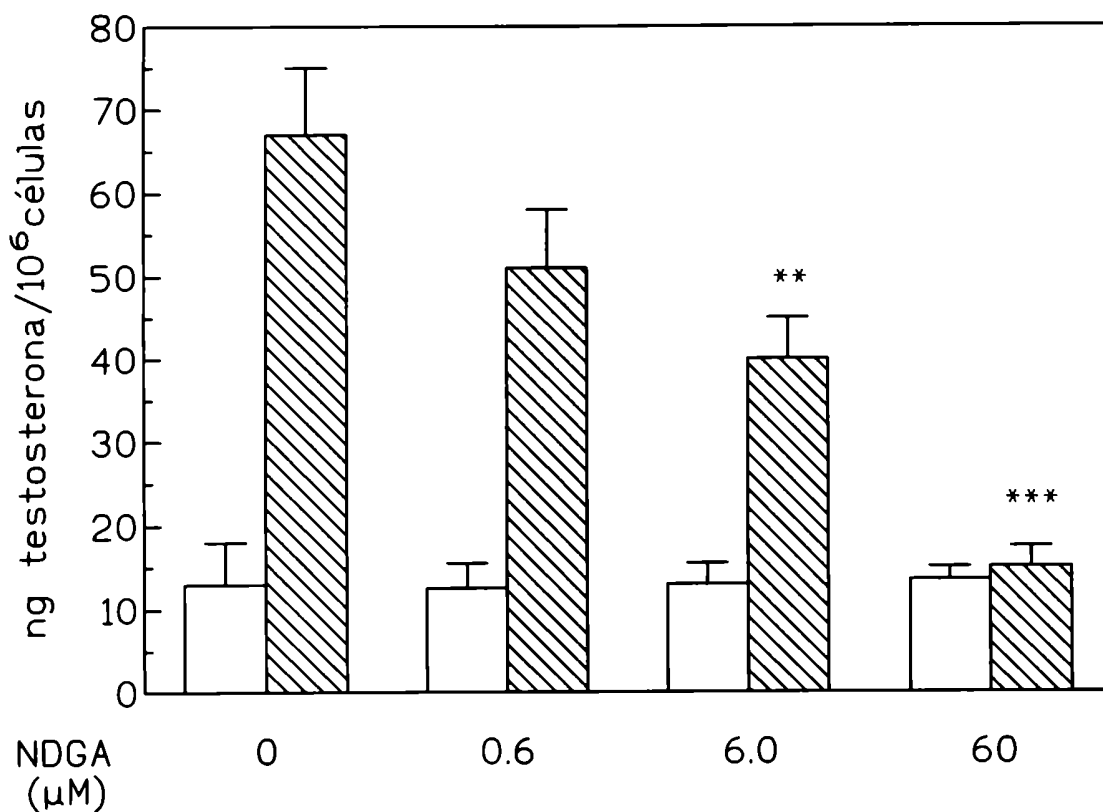
Los resultados obtenidos fueron corroborados midiendo la producción de corticosterona en el medio de incubación de células adrenales tratadas con ACTH 10^{-10} M luego de la pre-incubación con esculetina 100 μM y ácido cafeico 50 μM , obteniéndose los valores que se muestran en la Tabla VII. En la misma tabla se muestran los valores obtenidos cuando se midió la testosterona producida por células de Leydig estimuladas con LH y luego de ser pre-incubadas con esculetina y ácido cafeico.

La inhibición en la producción de testosterona fue estudiada también en presencia de concentraciones crecientes de ETYA (fig. 19), observándose para este inhibidor una DI_{50} : 5,6 mM.

Estos resultados claramente demuestran que la metabolización del AA por la vía de las lipoxigenasas constituye un paso obligatorio en la esteroidogénesis estimulada por dosis fisiológicas de ACTH en células adrenales y de LH en células de Leydig cumpliéndose lo planteado en el requisito b.

Con el objeto de estudiar el requisito c, se investigó el efecto del agregado exógeno de AA en células de Leydig y en células aisladas de ZF adrenal. Para ello en ambos casos, las células fueron obtenidas tal como se describe en materiales y métodos e incubadas con diferentes concentraciones de AA disuelto en etanol. El tubo control contenía solamente el vehículo de disolución. En cualquier caso, la concentración final de etanol fue menor al 0,5 %. En la figura 20 puede observarse que el AA a una concentración de 25 μM produce un aumento significativo en la

FIGURA 18: Efecto de NDGA sobre la producción de testosterona estimulada por LH en células de Leydig aisladas.



Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de NDGA o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de LH 0,75 mUI / ml (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$) * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$

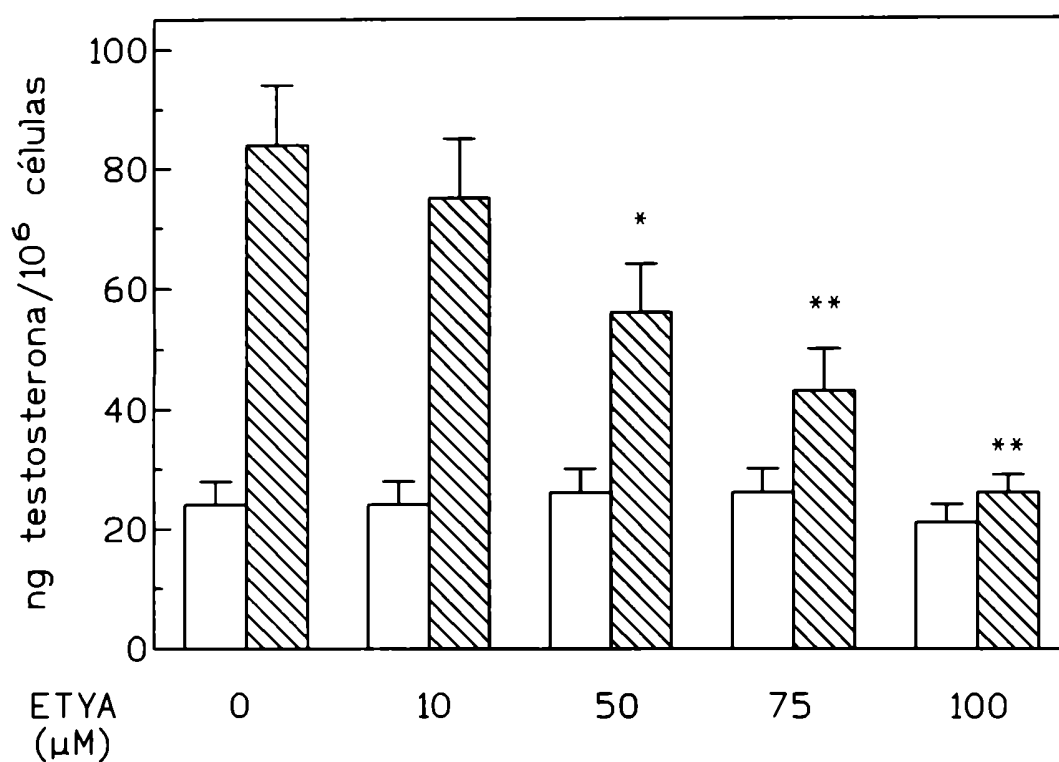
TABLA VII: Efecto de esculetina y ácido cafeico sobre la producción de corticosterona y testosterona.

Inhibidor	Control	ACTH
	ng corticosterona /10 ⁵ células	
---	9,60 ± 0,90	47,40 ± 5,40
Esculetina	10,10 ± 1,00	16,90 ± 3,10*
Acido. cafeico	8,40 ± 2,20	12,15 ± 2,40*

Inhibidor	Control	LH
	ng testosterona /10 ⁶ células	
---	14,40 ± 1,80	72,60 ± 2,10
Esculetina	14,40 ± 2,00	17,60 ± 3,20**
Acido. cafeico	13,20 ± 2,40	16,70 ± 1,80**

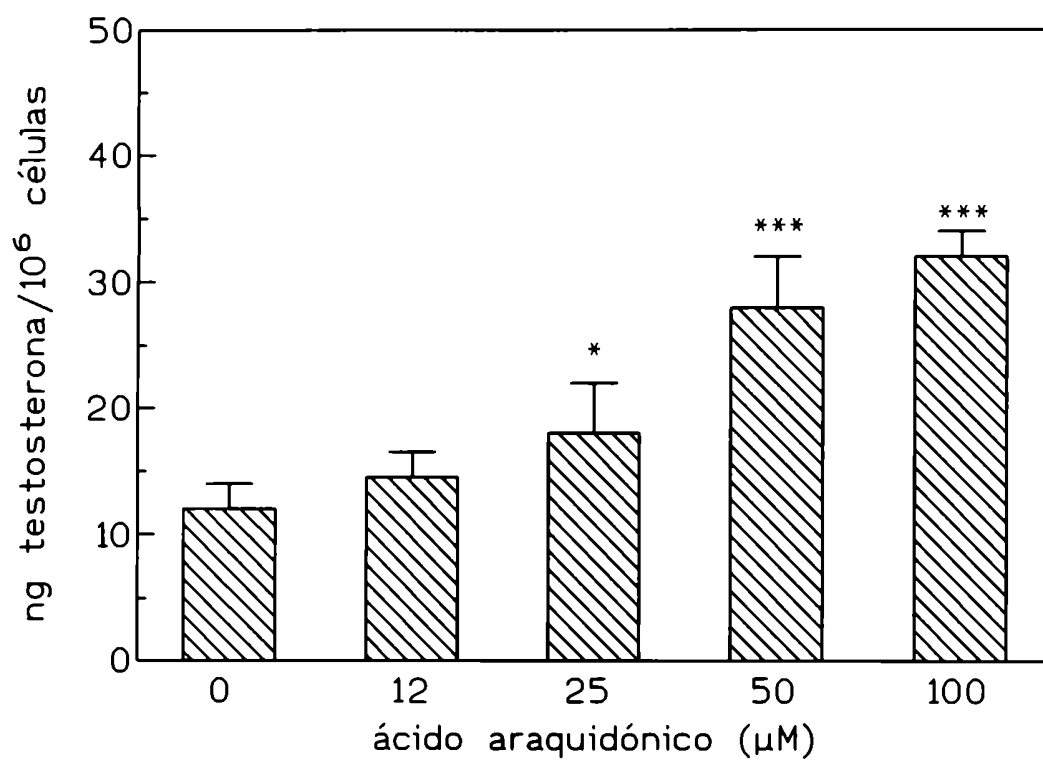
Células aisladas de ZF de corteza adrenal (10⁵ células/ml) y células de Leydig (10⁶ células/ml) fueron incubadas por 15 min. a 37 °C con esculetina 100 µM, ácido cafeico 50 µM o vehículo y luego durante 120 min. en presencia de ACTH 10⁻¹⁰ M o de LH 0,75 mUI/ml respectivamente. La producción de corticosterona y de testosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media ± DS, n=3; * p <0,05; **p < 0,01)

FIGURA 19: Efecto de ETYA sobre la producción de testosterona estimulada por LH en células de Leydig.



Células de Leydig aisladas fueron incubadas (10^6 células/ml) por 30 min. en presencia de ETYA o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de LH 0,75 mUI/ml LH (barras rayadas), o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3) * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

FIGURA 20: Estimulación de la síntesis de testosterona por ácido araquidónico.



Células de Leydig (10^6 células/ml) fueron incubadas por 180 min. en presencia de diferentes concentraciones de AA disuelto en etanol, tal como se describe en materiales y métodos. (media \pm DS, n=4) *p < 0,05, *** p < 0,0005.

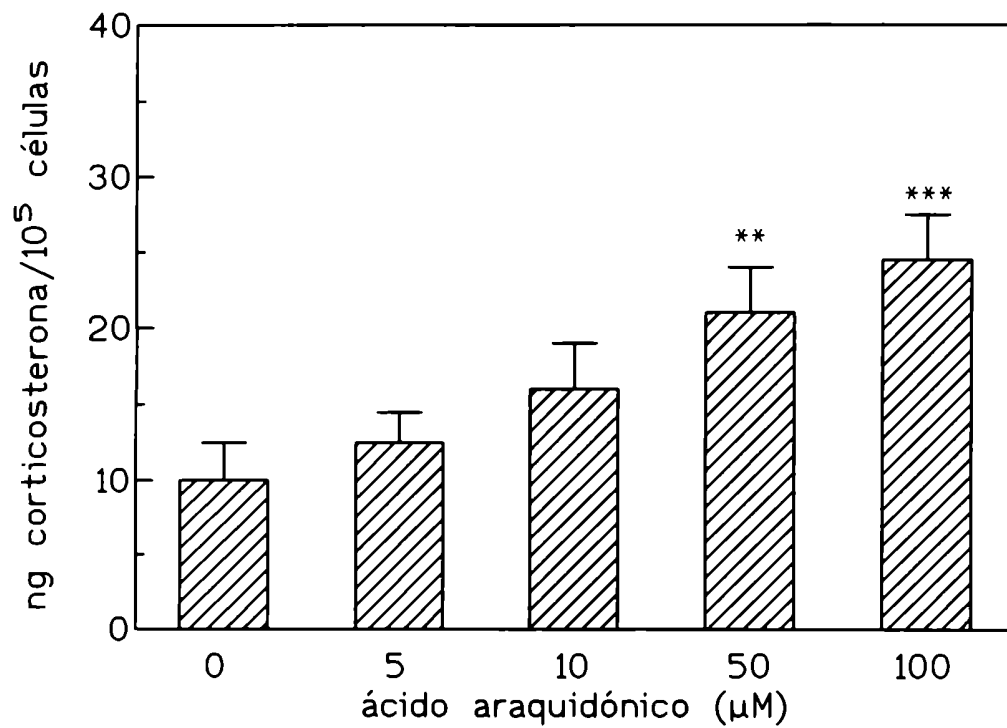
producción de testosterona en células de Leydig. A una dosis de 50 μM el AA produce una estimulación de aproximadamente 3 veces con respecto al control, resultando ser esta el 34% de la obtenida a dosis saturantes de LH. Es de destacar que mayores concentraciones de AA (100 μM) no producen un nuevo incremento en la síntesis de testosterona. En células adrenales, AA 10 μM produce un ligero incremento en la producción de corticosterona (fig. 21), y 100 μM estimula la producción de esteroides en un 37% con respecto a la estimulación obtenida por acción hormonal. Estos resultados nos llevarían a decir, que el AA es capaz de mimetizar los efectos de la hormona en células de Leydig y células de ZF de la corteza adrenal.

Para estudiar el postulado d, las células adrenales fueron pre-incubadas con BPB y posteriormente se realizó la estimulación con AA, en estas condiciones se observó que las células tratadas con el inhibidor responden al AA de igual manera que los controles como se observa en la figura 22.

Para estudiar si la activación de la PLA_2 en el mecanismo de acción hormonal eran mediados por el segundo mensajero, esto es por AMPc o se producirían por una vía alternativa, las células de la ZF de corteza adrenal y células de Leydig aisladas fueron pre-incubadas con los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA y posteriormente estimuladas con db-AMPc 10^{-4} M.

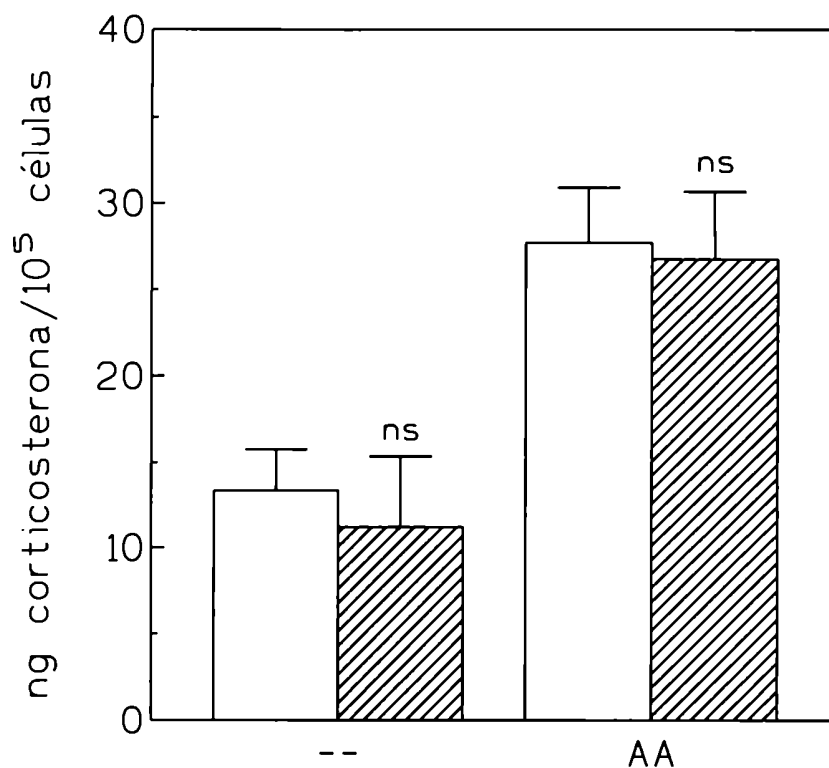
Las figuras 23 y 24 muestran los efectos de distintas concentraciones de BPB sobre la producción de corticosterona y testosterona estimuladas por db-AMPc; la DI_{50} para la producción de corticosterona fue de $1,5 \cdot 10^{-2}$ μM . En la fig. 25 se muestran los resultados obtenidos cuando el inhibidor utilizado fue quinacrina, encontrándose una DI_{50} de 34 μM .

FIGURA 21: Estimulación de la síntesis de corticosterona por ácido araquidónico.



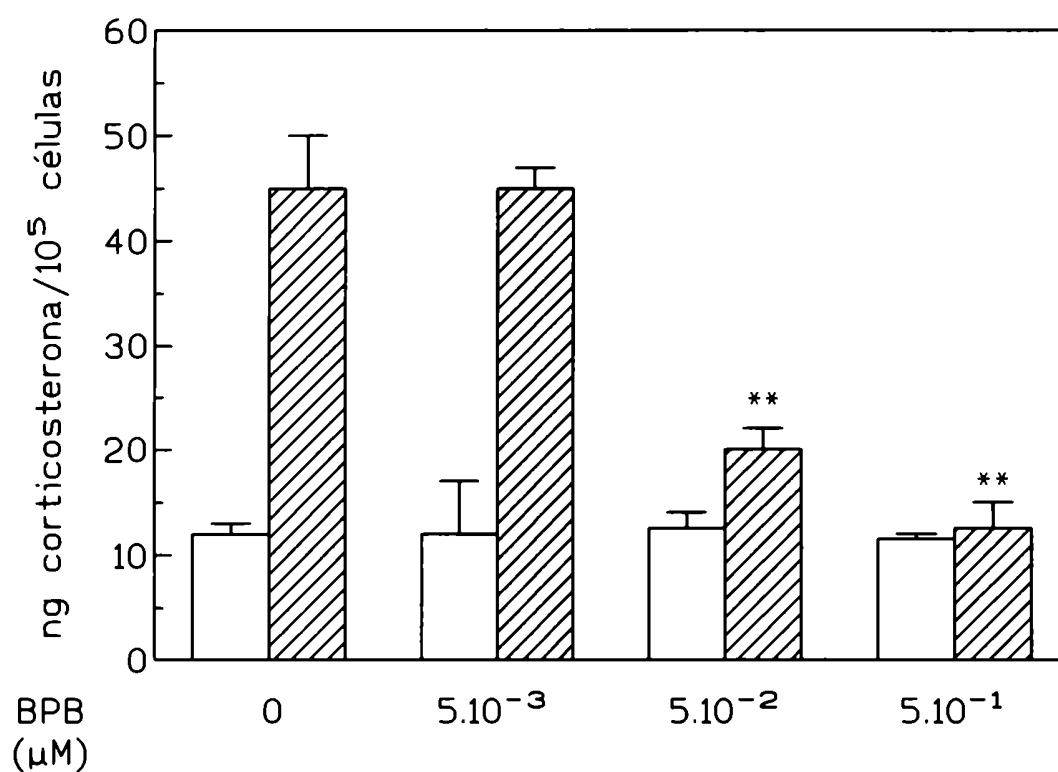
Células aisladas de ZF (10^5 células/ml) fueron incubadas por 120 min. en presencia de diferentes concentraciones de AA disuelto en etanol, tal como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$.

FIGURA 22: Efecto de BPB sobre la producción de corticosterona estimulada por AA en células de ZF de corteza adrenal.



Células de ZF aisladas (10^5 células/ml) fueron incubadas por 30 min. en presencia de BPB $5 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$ (barras rayadas) o vehículo (barras lisas) y luego durante 120 min. en presencia de AA $100 \mu\text{M}$ o en su ausencia. La producción de corticosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$).

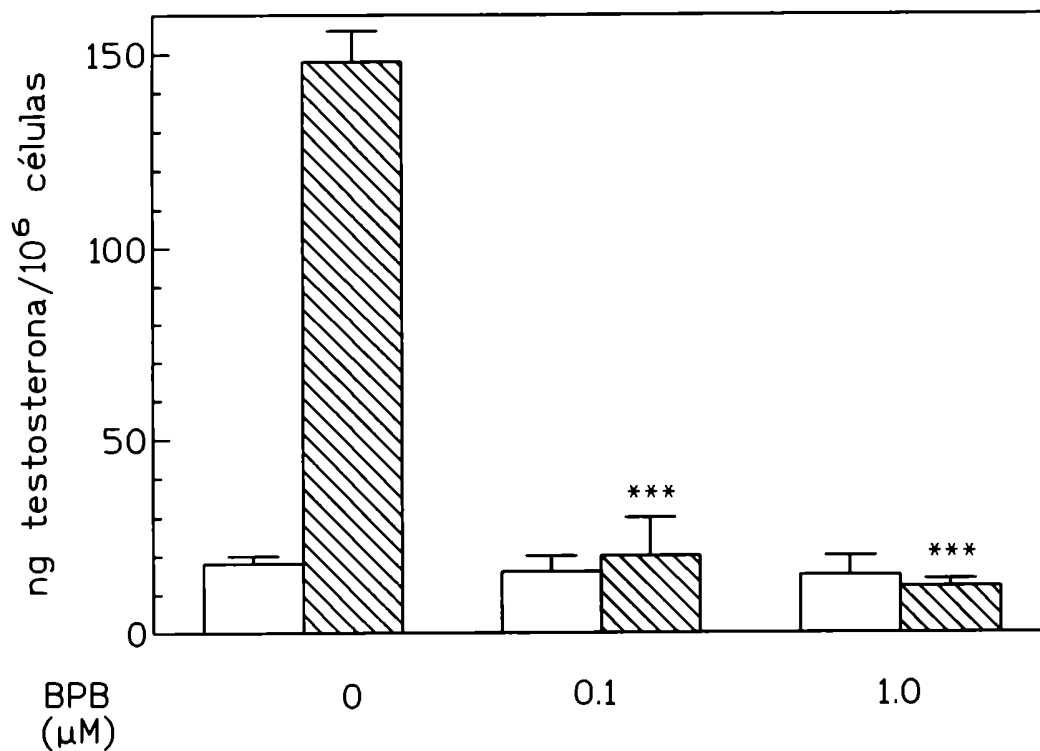
FIGURA 23: Efecto de BPB sobre la producción de corticosterona estimulada por db-AMPC en células de ZF de corteza adrenal.



Células de ZF aisladas (10^5 células/ml) fueron incubadas por 30 min. en presencia de BPB o vehículo y luego durante 120 min. en presencia de db-AMPC 10^{-4} M (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de corticosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos.

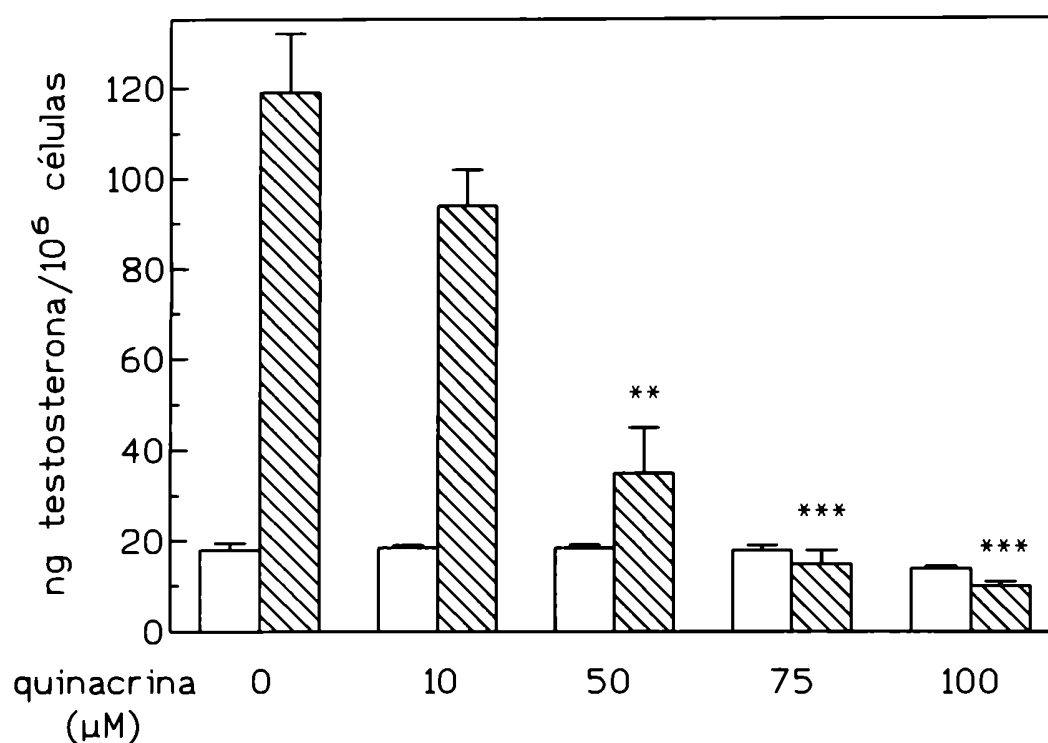
($X \pm DS$, $n=3$) ** $p < 0,01$.

FIGURA 24: Efecto de BPB sobre la producción de testosterona estimulada por db-AMPC en células de Leydig.



Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. en presencia de BPB o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de db-AMPC 10^{-4} M (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3), *** $p < 0,001$.

FIGURA 25: Efecto de quinacrina sobre la producción de testosterona estimulada por db-AMPc en células de Leydig aisladas.



Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de quinacrina o vehículo y luego durante 180 min. en presencia de db-AMPc 10^{-4} M (barras rayadas), o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$), ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

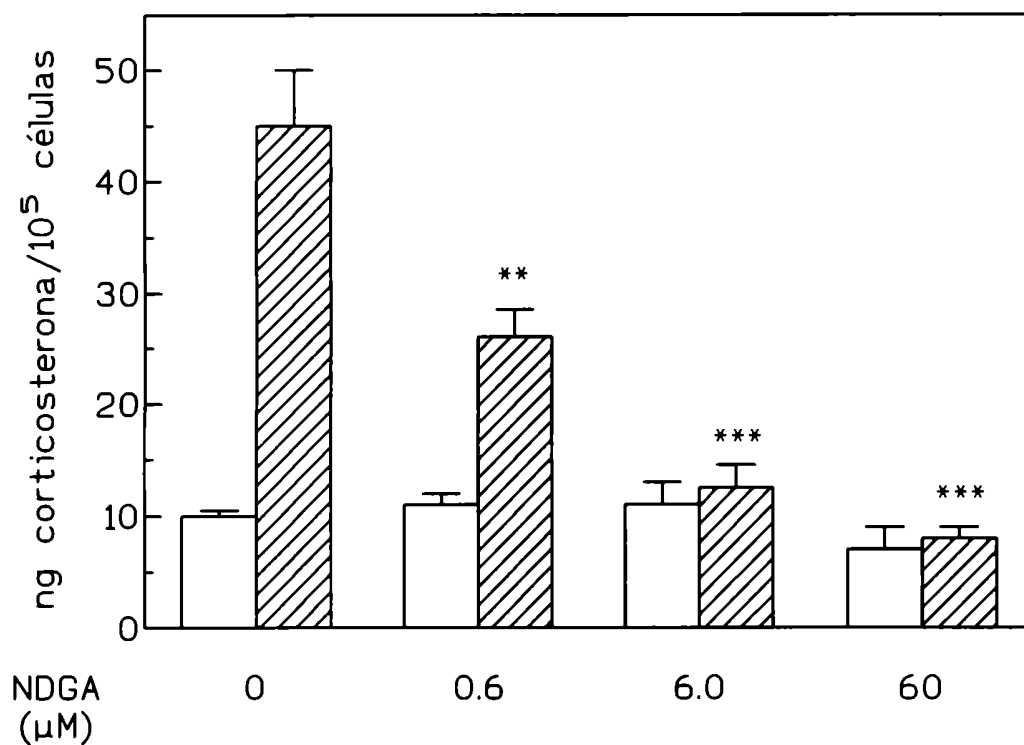
Los resultados indican que los inhibidores de la liberación del AA en las mismas dosis que bloquean la acción de las hormonas tróficas anulan el efecto de su segundo mensajero (fig. 23, 24 y 25), sugiriendo que la liberación de AA es en células de ZF adrenal y en células de Leydig un evento mediado por AMPc.

Por otra parte, NDGA inhibe la producción de corticosterona estimulada por db-AMPc, en células aisladas de ZF con un $DI_{50} = 0,5 \mu M$ (fig. 26) y de testosterona con un $DI_{50} = 8,6 \mu M$ (fig. 27). Los valores de DI_{50} obtenidos en ambos casos son del orden de los observados para la esteroidogénesis estimulada por ACTH o LH respectivamente. Resultados similares pueden observarse en la fig. 28 para la acción de ETYA, encontrándose en este caso una $DI_{50} = 30 \mu M$.

A pesar de que la identificación de los metabolitos del AA involucrados en la acción de ACTH y LH requiere mayor estudio, los datos claramente indican que un aumento en la concentración citosólica de AMPc y la liberación y metabolización del AA por la vía de las LO y la estimulación de la esteroidogénesis son procesos funcionalmente relacionados.

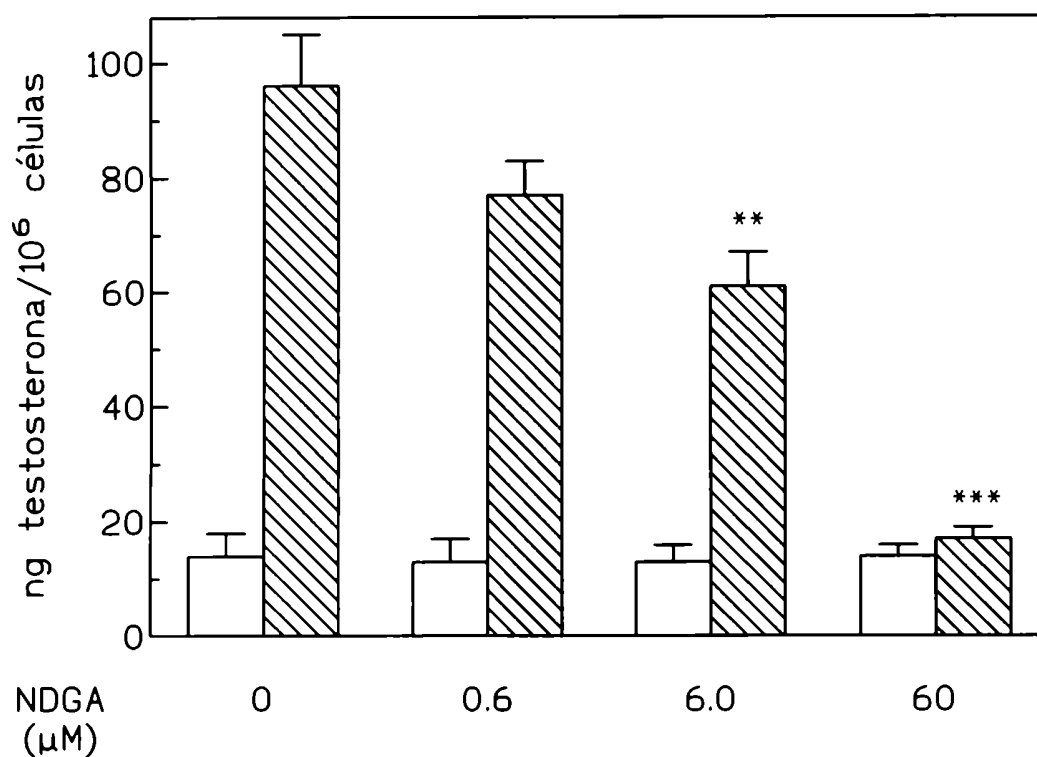
Para estudiar el último postulado, la participación del AA en la transducción del mensaje de ACTH y LH fue analizada evaluando la capacidad de estas hormonas para liberar 3H ácido araquidónico de células de ZF y de Leydig pre-marcadas. Al término de la marcación las células fueron lavadas e incubadas en presencia de la hormona sin nuevo agregado de radiactividad. Concluida la estimulación se separó el medio del sedimento celular por centrifugación. La figura 29 muestra que ACTH estimula la liberación intracelular de AA un 300-400% por encima de los niveles basales.

FIGURA 26: Efecto de NDGA sobre la producción de corticosterona estimulada por db-AMPc en células aisladas de ZF de corteza adrenal.



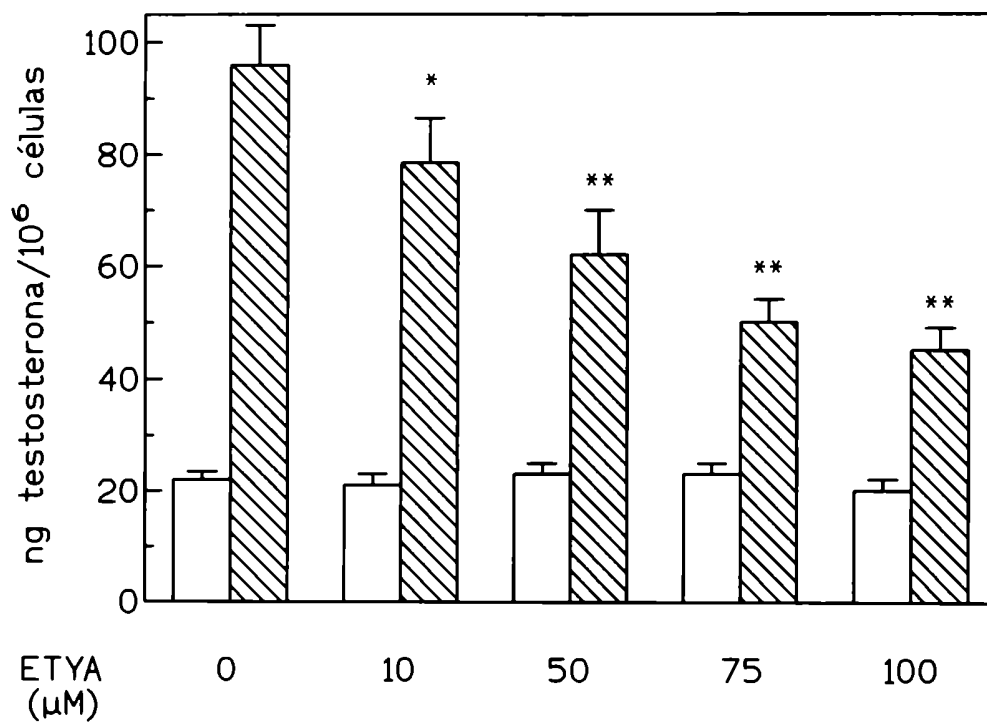
Células aisladas de ZF de corteza adrenal (10^5 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de NDGA o vehículo y luego durante 120 min. en presencia de db-AMPc 10^{-4} M (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de corticosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$), ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

FIGURA 27: Efecto de NDGA sobre la producción de testosterona estimulada por db-AMPC en células de Leydig aisladas.



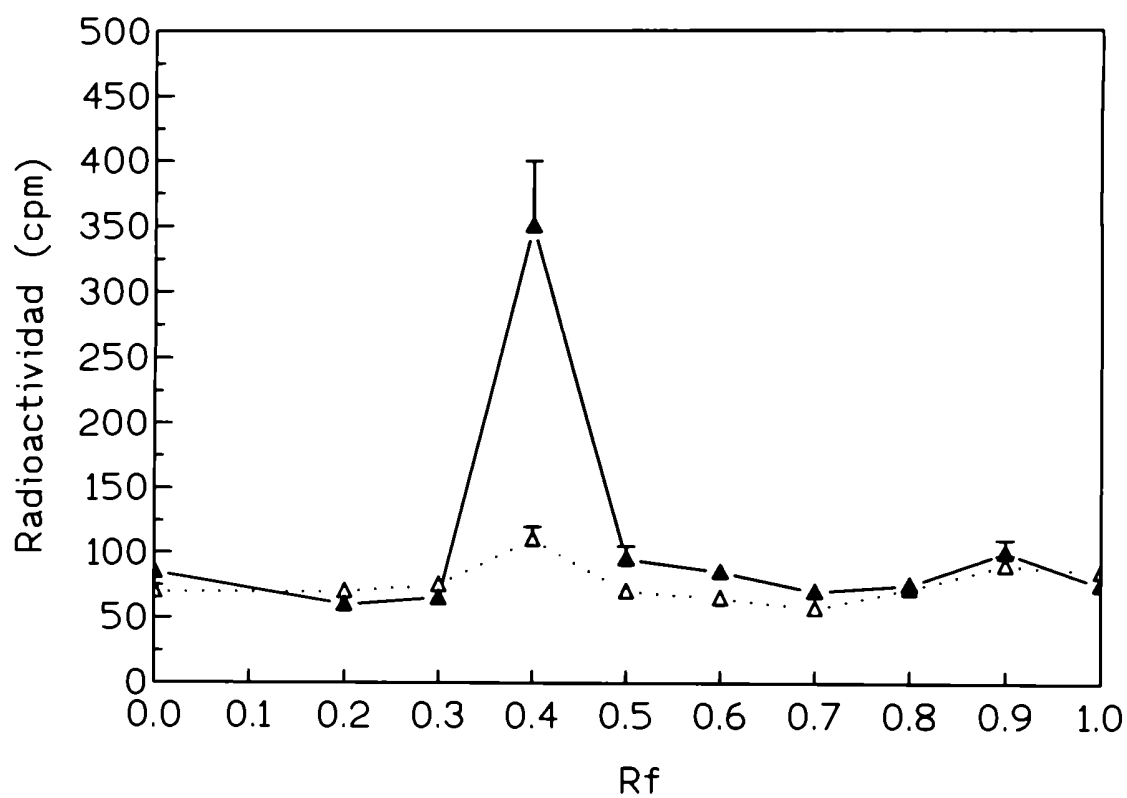
Células de Leydig aisladas (10^6 células/ml) fueron incubadas por 30 min. a 37°C con concentraciones crecientes de NDGA y luego durante 180 min. en presencia de db-AMPC 10^{-4} M (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue determinada por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$) ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

FIGURA 28: Efecto de ETYA sobre la producción de testosterona estimulada por db-AMPc en células de Leydig.



Células de Leydig aisladas fueron incubadas (10^6 células/ml) por 30 min. en presencia de ETYA y luego durante 180 min. en presencia de db-AMPc 10^{-4} M (barras rayadas) o en su ausencia (barras lisas). La producción de testosterona en el medio fue medida por RIE como se describe en métodos. (media \pm DS, $n=3$), * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

FIGURA 29: Estimulación de la liberación de AA en células de ZF por acción de ACTH.



Las células de la ZF adrenal fueron incubadas con ^3H AA ($1.5 \mu\text{Ci}$), lavadas e incubadas con (línea llena) o sin (línea punteada) ACTH 10^{-10} M por 90 min. El AA fue extraído, identificado y cuantificado luego de la cromatografía como se detalla en métodos. (media \pm DE, $n=6$)

Con el objeto de estudiar cuál es el sustrato de la PLA_2 , a partir de células adrenales pre-marcadas con 3H AA y estimuladas con ACTH se realizó la extracción y cromatografía de fosfolípidos. Se observó que la acción de ACTH produce una disminución de la radioactividad incorporada en la región de la placa de sílica gel que corresponde al ácido fosfatídico sin disminución significativa en el contenido radiactivo en la región correspondiente a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, o fosfatidilinositol.

Según lo descripto, el AA cumpliría todos los requisitos para ser considerado un intermediario en el mecanismo de acción de ACTH y LH, es decir: la hormona en las mismas dosis que estimula la esteroidogénesis, estimula la liberación de AA; este incremento en los niveles intracelulares de AA precede a la síntesis de esteroides; los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA inhiben la respuesta final; es posible imitar la acción hormonal agregando el intermediario exógenamente. Adicionalmente, hemos demostrado que en células pre-incubadas con los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA, un derivado permeable del AMPc es incapaz de ejercer su efecto estimulatorio.

SECCION III: INTEGRACION DEL ESTIMULO AMP_C - PKA - AA EN LA CASCADA DE EVENTOS HORMONO-DEPENDIENTES.

III-1: Introducción.

Los resultados descriptos en la sección anterior indican que la liberación de AA por acción de una PLA_2 es un paso obligatorio para la esteroidogénesis inducida por ACTH en células adrenales y por LH en células de Leydig. Esta activación ocurriría en un paso posterior a la activación de la adenilato ciclasa. Como las acciones del AMP_C están asociadas con la activación de la proteína quinasa dependiente de AMP_C , sería lógico postular que en la activación de la PLA_2 ocurren eventos de fosforilación. Los posibles candidatos de dicha fosforilación podrían ser: la PLA_2 , una proteína que active la PLA_2 directamente, o una proteína que actúe asociándose con un inhibidor tónico de la PLA_2 .

La PLA_2 es una enzima que cliva fosfolípidos con liberación de AA. Similarmente a lo encontrado por nosotros en células adrenales se ha descripto en plaquetas, una PLA_2 específica para ácido fosfatídico (Billah y col, 1981). Esta enzima es activada por estímulo hormonal desconociéndose el mecanismo y los eventos que dan lugar a la activación de la misma. También se ha descripto que esta activación probablemente esté mediada por la fosforilación de proteínas (Crouch y Lapetina, 1986, Piomelli y Greengard, 1991).

La PKA no tiene alta especificidad de sustrato y cataliza la fosforilación de numerosos sustratos. En este contexto el estudio de la relación entre la activación de la PKA y la liberación de AA así como, la caracterización del sitio de acción de la PKA proporcionaría elementos para relacionar la fosforilación y la liberación de AA.

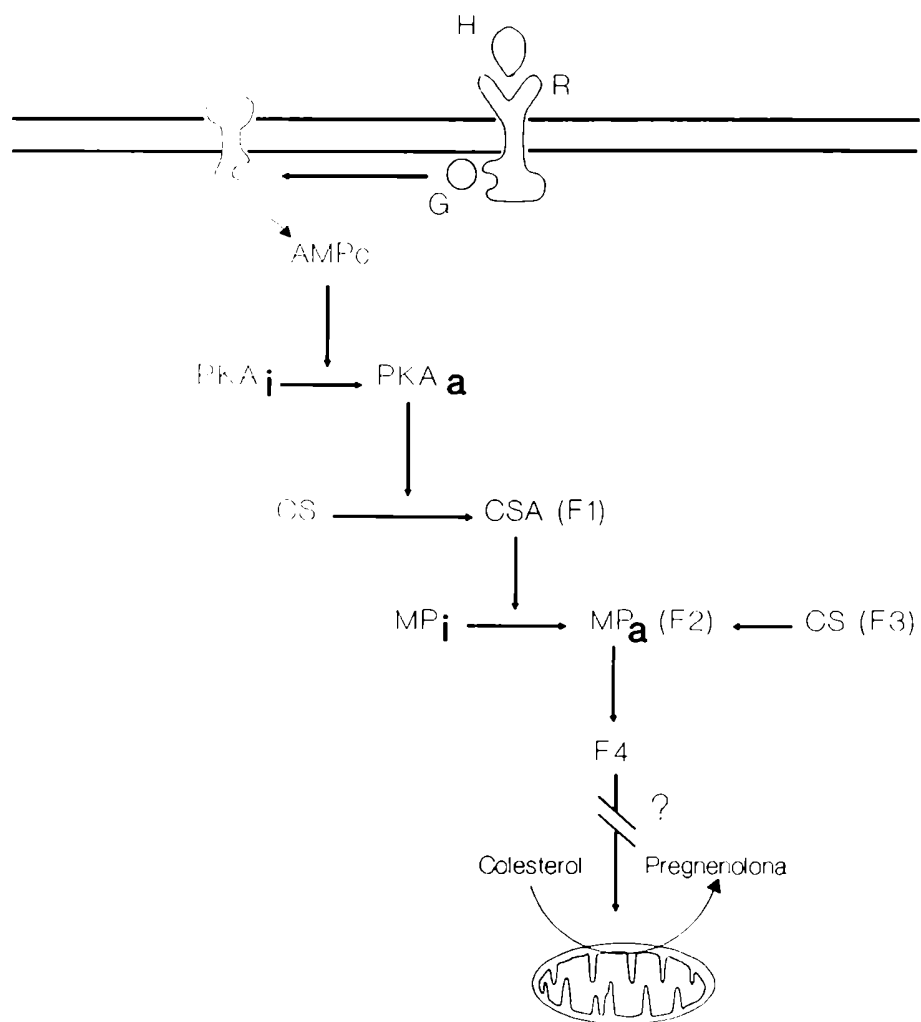
El estudio con fracciones subcelulares ha demostrado claramente la presencia de varios factores esteroideogénicos dependientes de ACTH en distintos compartimentos de las células adrenales. La activación de algunos de estos componentes pudo lograrse también *in vitro* en el sistema libre de células, sugiriendo la presencia de una cascada de eventos que probablemente relacione la fosforilación AMPc dependiente y el paso limitante de la síntesis de esteroides. Así, un factor 1 (F_1) (figura 30) generado en el citosol por acción de la hormona (CSA), puede subsecuentemente activar un paso en el sedimento de 105.000xg (MP_i) produciendo un factor 2 (F_2), el cual puede ser solubilizado por un factor 3 (F_3) presente en el citosol (CS) tanto de ratas controles como tratadas con la hormona produciendo un factor 4 (F_4) involucrado en la activación del paso limitante de la esteroideogénesis.

III-2: Estimulación de células Y_1 (kin) e Y_1 (cyc) con ACTH y 8-Br AMP_c.

Como se describe en métodos, la línea tumoral Y_1 sintetiza esteroides por acción de ACTH y 8-Br AMPc de manera similar a las células aisladas de adrenal de rata. Las mutantes Y_1 (cyc⁻) e Y_1 (kin⁻) presentan alteraciones en la ciclase y la quinasa respectivamente. Estas mutaciones implican que las células Y_1 (cyc⁻) no respondan al ACTH y que las Y_1 (kin⁻) no sean sensibles a la acción ni del ACTH ni del 8-Br AMP_c. Se utilizaron estos dos grupos de clones mutantes para evaluar la acción de la adenilato ciclase y la PKA en la formación de los factores esteroideogénicos descritos en la figura 30.

A partir de los tres tipos celulares se obtuvo como se describe en métodos el sobrenadante post-mitocondrial de células tratadas o no y se recombino

FIGURA 30: Cascada de eventos que llevan a la activación del Cit P450_{scc}



en el ensayo libre de células con mitocondrias aisladas de células Y_1 controles. En todos los experimentos se utilizaron mitocondrias aisladas de células Y_1 , para evitar cualquier efecto que la mutación pudiera tener sobre el Cit P450_{SCC} y estudiar solamente el efecto de éstas en la generación de los factores esteroidogénicos.

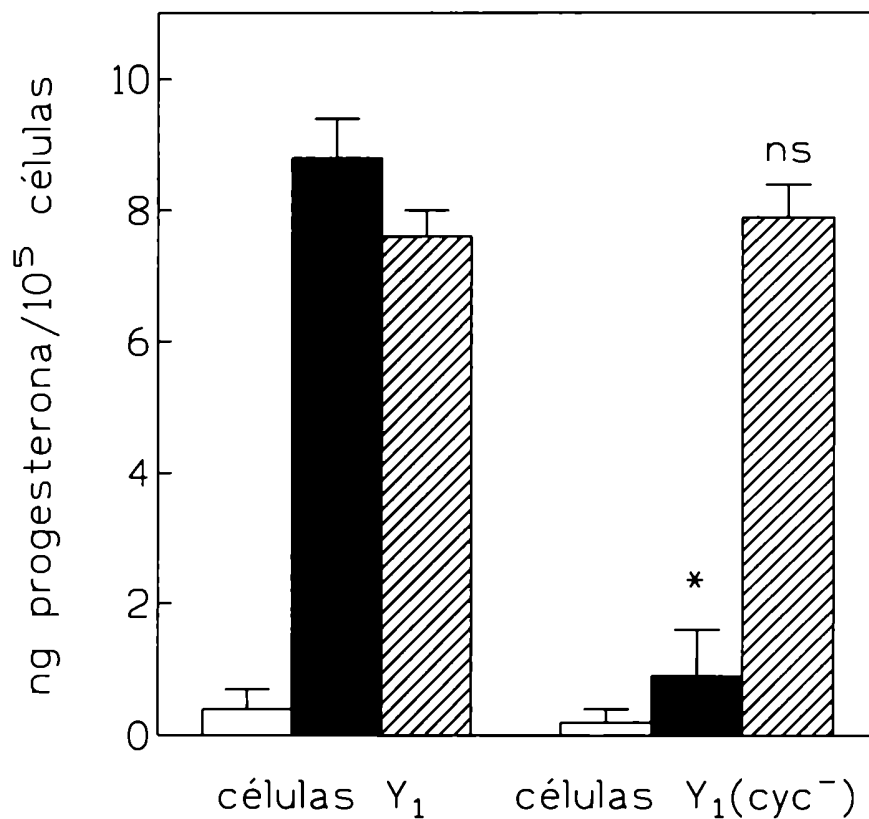
En células Y_1 tanto ACTH como 8-Br AMPc generan factores esteroidogénicos en el sobrenadante post-mitocondrial capaces de inducir la síntesis de progesterona en mitocondrias controles (fig. 31). En células $Y_1(\text{cyc}^-)$ el PMTS obtenido luego del tratamiento con ACTH no posee actividad cuando es recombinado en el ensayo libre de células. Sin embargo, la estimulación fue recobrada cuando el PMTS se aisló a partir de células $Y_1(\text{cyc}^-)$ tratadas con un análogo permeable del AMP_c en vez de ACTH (figura 31).

En un experimento similar pudo comprobarse que el sobrenadante post-mitocondrial aislado a partir de células $Y_1(\text{kin}^-)$ estimuladas con ACTH u 8-Br AMPc no presenta actividad esteroidogénica cuando se los utiliza en las mismas dosis que promueven la esteroidogénesis en las células Y_1 (fig. 32), siendo necesario en estas células dosis de 8-Br AMPc hasta 600 veces mayores para activar la quinasa al 50 % del nivel alcanzado en las células Y_1 (Rae y col, 1979).

Estos experimentos sugirieron que la activación de la adenilato ciclasa y la PKA son necesarias para la formación de los factores esteroidogénicos presentes en el PMTS activado.

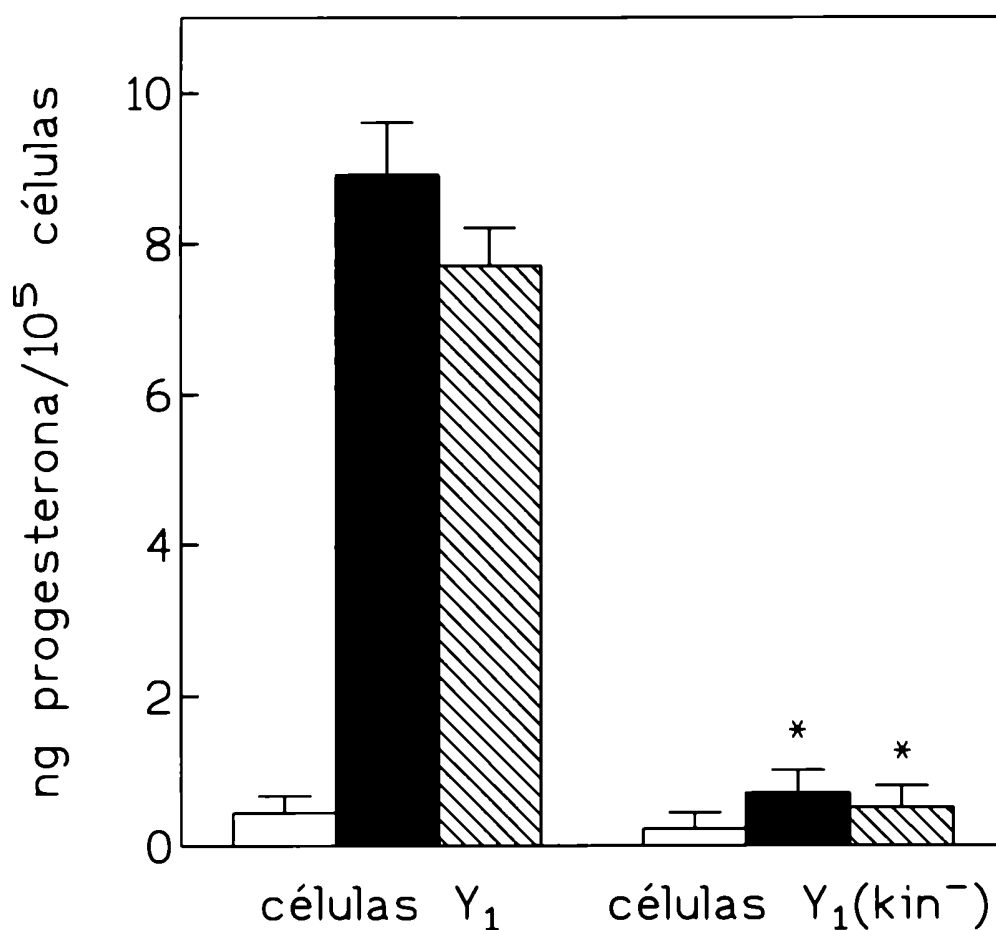
Cuando el sobrenadante post-mitocondrial fue centrifugado para obtener el citosol y el sedimento de 105.000xg y se realizó el ensayo de recombinación se observó que el citosol aislado de células Y_1 tratadas con ACTH en presencia de las fracciones microsomal y mitocondrial de células Y_1 sin tratamiento produce un incremento en la síntesis de progesterona de 4 veces con respecto al citosol

FIGURA 31: Producción de factores esteroideogénicos por células tumorales Y_1 o Y_1 (cyc^-).



Las células Y_1 o Y_1 (cyc^-) controles (barras lisas) o estimuladas con ACTH 10^{-10} M (barras sólidas) u 8-Br AMP_c 10^{-4} M (barras rayadas) fueron lisadas y sometidas a fraccionamiento subcelular como se describe en métodos. El PMTS obtenido en cada caso fue recombinado para realizar el ensayo libre de células con mitocondrias provenientes, en todos los casos, del fraccionamiento subcelular de células Y_1 sin tratamiento. (media \pm DS, n=3) * $p < 0,005$.

FIGURA 32: Producción de factores esteroideogénicos por células tumorales Y_1 o $Y_1(kin^-)$.



Las células Y_1 o $Y_1(kin^-)$ controles (barras lisas) o estimuladas con ACTH 10^{-10} M (barras sólidas) u 8-Br AMP_c 10^{-4} M (barras rayadas) fueron lisadas y sometidas a fraccionamiento subcelular como se describe en métodos. El PMTS obtenido en cada caso fue recombinado para realizar el ensayo libre de células con mitocondrias provenientes, en todos los casos, del fraccionamiento subcelular de células Y_1 sin tratamiento. (media \pm DS, n=3) * $p < 0,005$.

control (Tabla VIII). La recombinación del citosol aislado a partir de células Y_1 (kin^-) tratadas con ACTH u 8-Br AMPc con la correspondiente fracción microsomal, y mitocondrias obtenidas de células Y_1 no produce un incremento en la síntesis de P_4 con respecto al citosol obtenido de células sin tratamiento (Tabla VIII). Además, pudo demostrarse que la alteración en las células Y_1 (kin^-) se encontraría en un componente soluble ya que dicha actividad no se repone al recombinar el citosol de las células mutadas previamente tratadas con ACTH o AMPc con las restantes fracciones celulares obtenidas a partir de células portando un genotipo normal (Tabla VIII). Estos resultados sugirieron que en el citosol de estas células existe un proceso AMPc dependiente estimulable por ACTH.

III-3: Efecto del inhibidor de la PKA en el ensayo libre de células.

Para analizar la participación de la quinasa AMPc dependiente en la activación del sobrenadante post-mitocondrial, se estudió el efecto del inhibidor específico de la proteína quinasa AMPc dependiente (PKI) sobre la acción del PMTS a nivel mitocondrial. Los resultados obtenidos se muestran en la fig. 33. El PMTS derivado de glándulas adrenales tratadas con ACTH incrementa la síntesis neta de P_4 en mitocondrias controles en presencia o en ausencia del PKI; esto implicaría que el proceso de fosforilación ocurre previamente al aislamiento de dicha fracción.

Para investigar esta posibilidad, la fracción post-mitocondrial fue centrifugada a 105.000xg para obtener el citosol y el sedimento de 105.000xg. La activación de los factores microsomales por el citosol obtenido a partir de glándulas

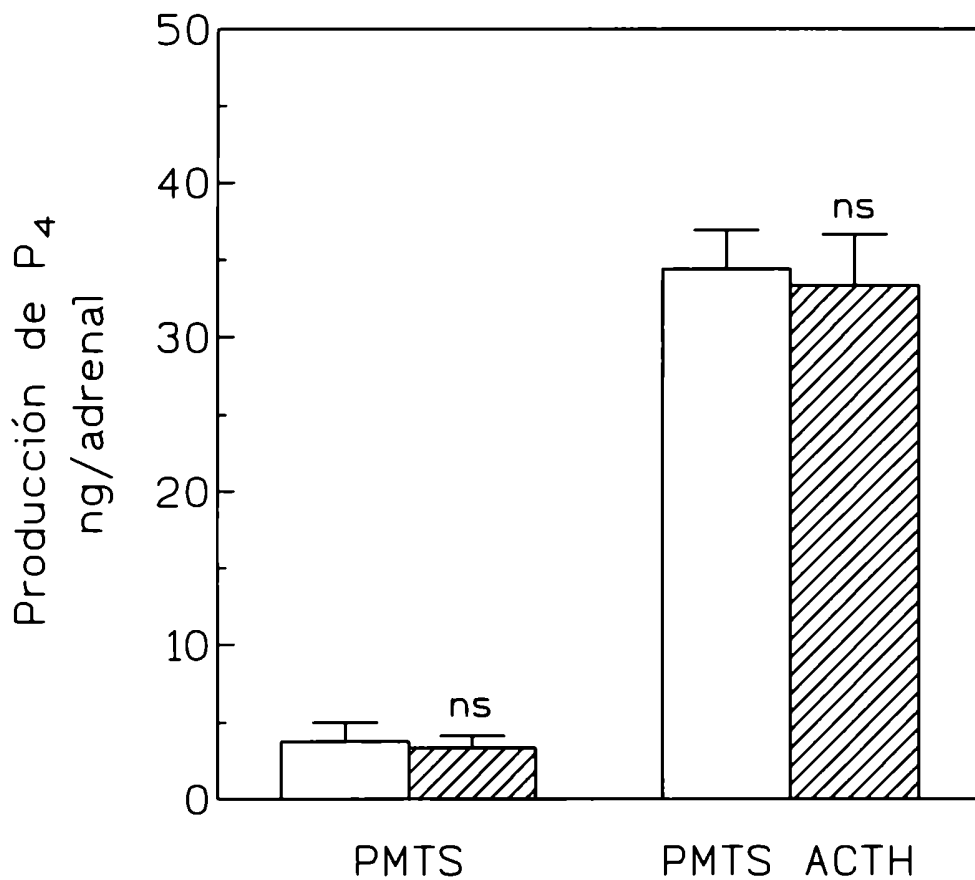
TABLA VIII: Producción de progesterona por factores esteroidogénicos aislados de células tumorales Y_1 o $Y_1(kin^-)$.

Citosol	Tratamiento	Fuente de fracción microsomal:	Progesterona (ng/ 10^5 células)
Células Y_1	---	Células Y_1	$0,34 \pm 0.03$
	ACTH		$1,38 \pm 0.13^*$
	ACTH	Células $Y_1(kin^-)$	$1,42 \pm 0.15^*$
Células $Y_1(kin^-)$	---	Células Y_1	$0,35 \pm 0.04$
	ACTH		$0,35 \pm 0.03$
	AMPc		$0,33 \pm 0.04$
	---	Células $Y_1(kin^-)$	$0,30 \pm 0.02$
	ACTH		$0,32 \pm 0.03$
	AMPc		$0,37 \pm 0.03$

Las células Y_1 o $Y_1(kin^-)$ fueron estimuladas con ACTH 10^{-10} M u 8-Br AMP_c 10^{-4} M y posteriormente lisadas y sometidas a fraccionamiento subcelular como se describe en métodos. El citosol obtenido fue recombinado para realizar el ensayo libre de células con mitocondrias provenientes, en todos los casos, del fraccionamiento subcelular de células Y_1 sin tratamiento.

(media \pm DS, n=3). * $p < 0,01$

FIGURA 33: Efecto del PKI sobre la neosíntesis de P_4 por PMTS aislado luego de la acción de ACTH en ZF adrenal.



El PMTS obtenido de glándulas adrenales de animales tratados con ACTH fue pre-incubado 10 minutos a 37°C en presencia de $70\text{ }\mu\text{g}$ /incubación de PKI (barras rayadas), previamente a la realización del ensayo de recombinación.

(media \pm DS, $n=3$)

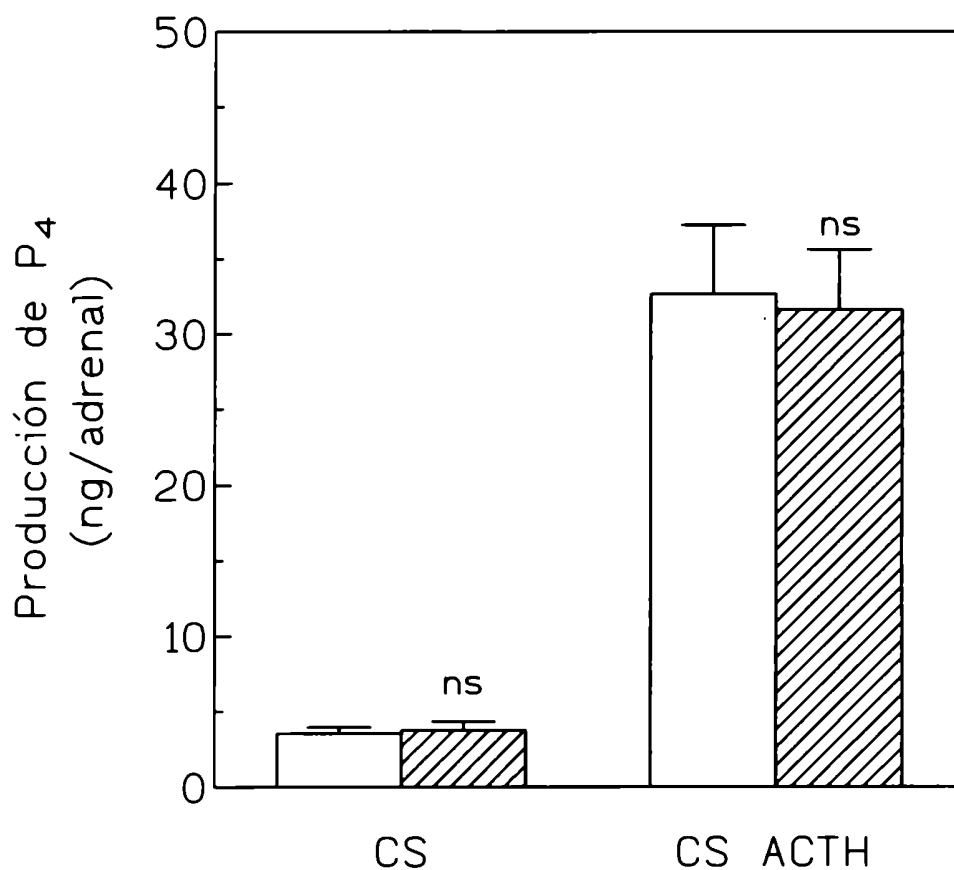
tratadas con ACTH no es inhibible por el agregado de PKI en el ensayo de recombinación como se muestra en la fig. 34. Estos resultados indican que el sustrato endógeno de la PKA necesario para activar la fracción microsomal se encontraría en el citosol.

III-4 : Producción de factores esteroidogénicos *in vitro* por AMP_C

Los experimentos siguientes fueron llevados a cabo con el objeto de inducir la fosforilación de las proteínas citosólicas. Para ello, un citosol obtenido de glándulas adrenales controles fue incubado con diferentes concentraciones de AMP_C (10^{-7} - 10^{-3} M) por 10 minutos a 37°C, seguido de 9,5 minutos en presencia del sedimento de 105.000xg y mitocondrias correspondientes a glándulas adrenales no tratadas. Los resultados se muestran en la figura 35. En presencia de AMP_C, el citosol obtenido de adrenales no estimuladas fue capaz de incrementar la síntesis de P₄ obteniendo un efecto dosis dependiente, llegando a 4 veces de estimulación con AMP_C 10^{-3} M. En estas condiciones es ahora posible observar un efecto del inhibidor de la PKA en el ensayo de recombinación. La figura 36 muestra la inhibición de PKI (70 ug) sobre la estimulación de la síntesis de P₄ obtenida con AMP_C 10^{-5} M.

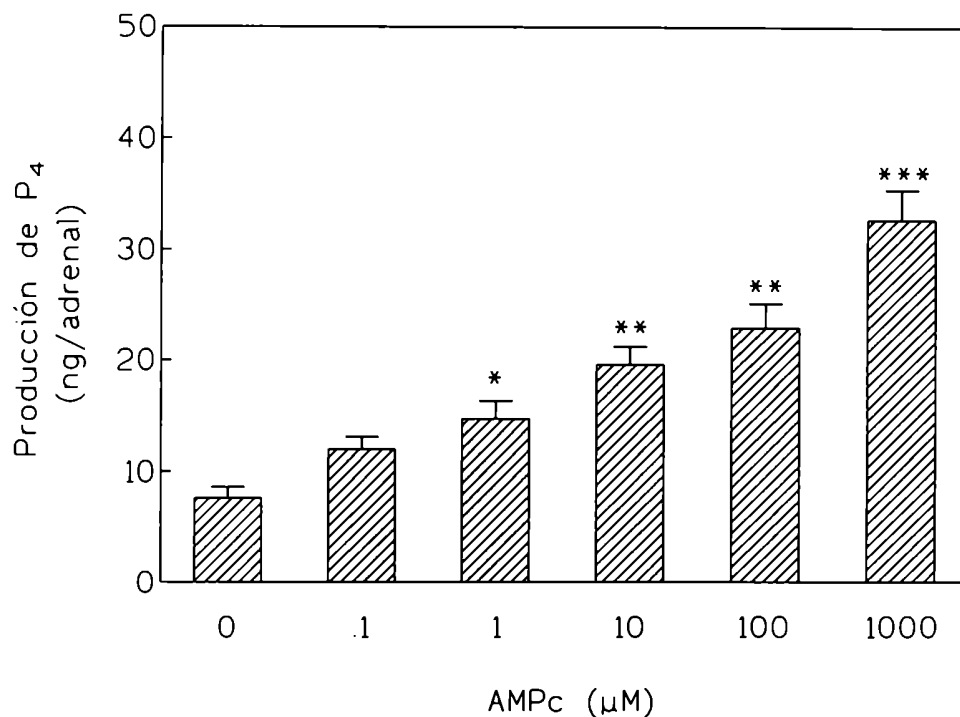
Los experimentos de recombinación presentados sugerirían que la actividad de la PKA presente en el citosol y la fosforilación de una proteína citosólica son necesarias para producir la activación de la fracción microsomal. Para confirmar esta hipótesis se aisló la fracción microsomal a partir de adrenales no estimuladas, la cual fue incubada en presencia de AMP_C solamente o de AMP_C y proteína

FIGURA 34: Efecto del PKI sobre la neosíntesis de P_4 por el citosol aislado luego de la acción de ACTH en ZF adrenal.



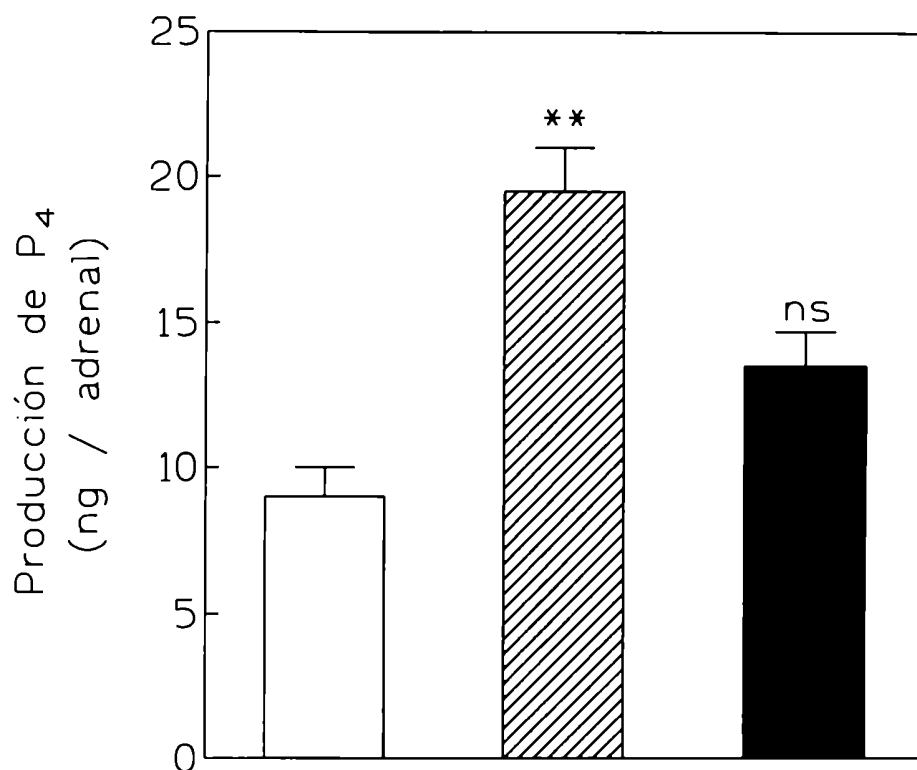
El citosol obtenido de glándulas adrenales de animales tratados con ACTH fue pre-incubado 10 min. a 37 °C en presencia de 70 μ g/incubación de PKI (barras rayadas), previamente a la realización del ensayo de recombinação. En dicho ensayo el citosol fue re combinado con las fracciones particuladas y mitocondrias provenientes de adrenales controles. (media \pm DS, n=3)

FIGURA 35: Producción de factores esteroidogénicos *in vitro* por AMPc. Curva dosis-respuesta.



El citosol aislado de glándulas adrenales sin tratamiento fue incubado durante 10 min. en presencia de diferentes concentraciones de AMP_c. Al término de dicha incubación, el CS obtenido fue re combinado en el ensayo libre de células con el sedimento de 105.000xg y mitocondrias de adrenales controles como se describe en métodos. (media ± DS, n=3) * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

FIGURA 36: Producción de factores esteroideogénicos *in vitro* por AMPc.
Efecto del PKI.



El citosol aislado de glándulas adrenales sin tratamiento fue incubado durante 10 min. en ausencia (barras lisas) o en presencia de AMPc 10^{-5} M (barras rayadas), o PKI + AMPc 10^{-5} M (barras sólidas). Al término de dicha incubación, el CS obtenido fue recombinaado en el ensayo libre de células con el sedimento de 105.000xg y mitocondrias de adrenales controles como se describe en métodos. (media \pm DS, n=3) **: $p < 0,01$.

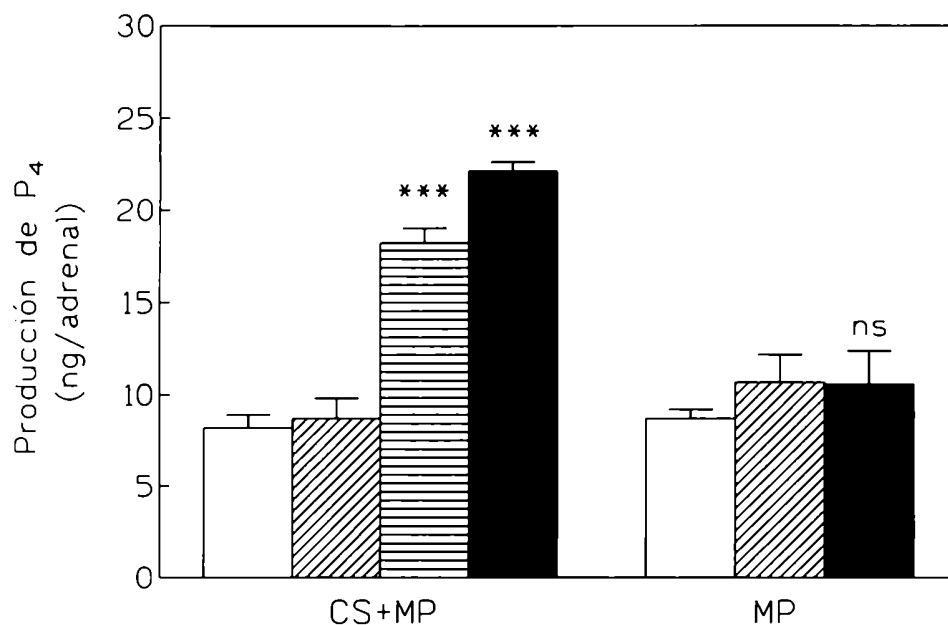
quinasa AMP_C dependiente pero en ausencia de la fracción citosólica. La figura 37 muestra que en ningún caso el sedimento de 105.000xg sólo fue capaz de estimular la síntesis de P₄ en mitocondrias aisladas, necesitándose para ello la presencia de la fracción citosólica.

Los resultados presentados aquí demuestran que el agregado de AMP_C a un citosol proveniente de células adrenales sin tratamiento produce una estimulación en la neosíntesis de P₄. Este evento sumado al hecho de que el único receptor intracelular descrito para el AMP_C es la subunidad reguladora de la PKA y que dicha estimulación es bloqueable por un inhibidor de la PKA, sugeriría que la fosforilación dependiente de AMP_C/PKA de proteína/s soluble/s es un requisito en la activación de los pasos siguientes en la síntesis de esteroides (liberación de AA).

Los experimentos mostrados anteriormente demuestran que: 1) el citosol derivado de células estimuladas con ACTH o AMP_C es capaz de incrementar la síntesis de esteroides mitocondriales cuando se lo combina con las fracciones apropiadas, 2) el citosol derivado de células que no contienen ciclase o quinasa, estimuladas con ACTH no incrementan la esteroidogénesis, 3) el AMP_C en conjunto con la PKA *in vitro* transforman en activo un citosol control, 4) los inhibidores de la fosforilación anulan este efecto; por lo tanto es posible considerar al citosol como un sitio fisiológico para la fosforilación de intermediarios en la acción de ACTH sobre la esteroidogénesis.

III-V: Integración del AA en la cascada de eventos hormono-dependientes.

Los estudios siguientes fueron realizados para establecer la relación entre la

FIGURA 37: Producción *in vitro* de factores esteroideogénicos.

Se obtuvieron la fracción microsomal y el CS de ZF adrenales controles y fueron incubados 10 min. en presencia de: medio A (barras lisas), PKA (100 µg/incubación, barras diagonales), AMP_c 10⁻⁵ M (barras horizontales), o AMP_c 10⁻⁵ M + PKA (barras sólidas). Luego se realizó la recombinación con mitocondrias controles tal como se describe en métodos, sin agregado de la fracción citosólica. (media ± DS, n=3), *** p<0,001.

formación en el citosol del factor 1 (fosfoproteína) por activación de la quinasa A y la liberación de AA. Para realizar dichos estudios se utilizaron los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA en el sistema libre de células. Esto permite observar el efecto de estas drogas en los pasos específicos de la activación de la esteroidogénesis (es decir cual de los factores esteroidogénicos que participan en la cascada de eventos hormono - dependiente está relacionado con la liberación de AA).

Los datos obtenidos trabajando con los inhibidores en células de ZF o células de Leydig enteras ubicarían el sitio de acción de los inhibidores en un paso posterior a la generación de AMPc ya que no es posible estimular la biosíntesis de esteroides con db-AMPc en presencia de los inhibidores de la liberación y metabolización del AA.

Para confirmar estos resultados y profundizar el estudio del sitio de acción de los inhibidores, la ZF fue pre-incubada en presencia de BPB, NDGA, ácido. cafeico y esculetina, estimulada con ACTH 10^{-10} M, homogeneizada en Medio A, lavada y sometida a fraccionamiento subcelular para obtener el PMTS, tal como se describe en materiales y métodos, el cual fue recombinado con mitocondrias aisladas a partir de adrenales de animales no estimulados y que tampoco sufrieron ningún tratamiento *in vitro*, es decir mitocondrias obtenidas de igual manera que en la sección I.

Los datos de la Tabla IX muestran la incapacidad de los PMTS así obtenidos de estimular en mitocondrias el clivaje de la cadena lateral del colesterol. Cuando las células adrenales fueron pre-incubadas con el inhibidor de la liberación de AA y estimuladas con db-AMPc 10^{-4} M, el PMTS obtenido tampoco fue capaz de

TABLA IX: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF adrenal incubadas con PMTS ACTH - dependiente de ZF adrenal: efecto de la pre-incubación de la ZF con los inhibidores de la liberación y del metabolismo del AA.

Inhibidor	PMTS control	PMTS ACTH-dependiente
	Progesterona (ng/adrenal)	
---	4,2 ± 0,4	89,5 ± 3,7
BPB	3,0 ± 0,3	5,6 ± 0,4*
NDGA	4,0 ± 0,2	4,0 ± 0,5*
Acido. Cafeico	4,5 ± 0,5	5,1 ± 0,3*
Esculetina	3,7 ± 0,3	6,2 ± 0,4*

La ZF fue incubada por 30 min. a 37 °C en presencia o ausencia de BPB 0,5 µM, NDGA 5 µM, ácido cafeico 50 µM ó esculetina 100 µM; y luego por 90 min. con o sin ACTH 10⁻¹⁰ M. La ZF fue entonces homogeneizada y con las fracciones subcelulares obtenidas se realizó el ensayo de recombinación. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3, p<0,001)

estimular la conversión de colesterol en P_4 en mitocondrias obtenidas como acabamos de describir (Tabla X). Es necesario aclarar que el número de veces de estimulación de la síntesis de P_4 obtenido en el sistema de recombinación es mayor cuando el sobrenadante post-mitocondrial o el citosol provienen de adrenales estimuladas *in vitro* con ACTH 10^{-10} M que cuando los factores esteroidogénicos se aíslan a partir de glándulas provenientes de animales tratados *in vivo* con ACTH. Esto podría deberse, tal vez, a que el menor manipuleo requerido luego de la estimulación *in vitro* contribuya a mantener los factores esteroidogénicos generados por la hormona, y/o a que *in vitro* la presencia de un inhibidor de la fosfodiesterasa (MIX) durante la incubación permite alcanzar mayores niveles de AMPc, y/o a que *in vitro* no operan mecanismos inhibitorios que podrían desencadenarse *in vivo*.

Cuando la ZF de corteza adrenal fue incubada en presencia o ausencia de ACTH 10^{-10} M y el sobrenadante post-mitocondrial obtenido como se describe en métodos fue recombinado con mitocondrias provenientes de células de ZF no estimuladas, en presencia de los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA. Las dosis utilizadas para los inhibidores fueron: BPB 10 nM; NDGA 0,5 μ M; ácido cafeico 5 μ M y esculetina 10 μ M y se establecieron a partir de las utilizadas en los experimentos con células enteras. En la Tabla XI puede observarse que el agregado simultáneo de cualquiera de los inhibidores, las fracciones subcelulares y las mitocondrias no fue capaz de bloquear la síntesis mitocondrial de P_4 producida por el factor 4. Estos resultados indicarían que al estar el intermediario final (F_4) ya formado en el sobrenadante post-mitocondrial proveniente de glándulas tratadas con ACTH (Neher y col, 1982), los inhibidores no tienen efecto, indicando que la liberación de AA ocurre previamente a la activación de F_4 y sirven también para

TABLA X: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF adrenal incubadas con PMTS AMPc-dependiente de ZF de corteza adrenal: Efecto de la pre-incubación de la ZF adrenal con un inhibidor de la liberación del AA .

Inhibidor	PMTS control	PMTS-AMPc dependiente
---	Progesterona (ng/adrenal)	
	3,0 ± 0,3	78,5 ± 4,6
	4,0 ± 0,3	6,5 ± 0,5*
BPB		

La ZF fue incubada por 30 min. a 37 °C en presencia o ausencia de BPB 0,5 µM y luego por 90 minutos con o sin db-AMPc 10⁻⁴ M. La ZF fue entonces homogeneizada y con el PMTS obtenido se realizó el ensayo de recombinación. La producción de P₄ fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3, *: p<0,001)

TABLA XI: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF adrenal incubadas con PMTS ACTH-dependiente de ZF de corteza adrenal. Efecto *in vitro* de los inhibidores de la liberación y metabolismo de AA.

Tratamiento	Inhibidor	Progesterona (ng/adrenal)
PMTS control	---	3,7 ± 0,3
PMTS ACTH -dependiente	---	91,4 ± 2,9
	BPB	94,6 ± 5,0
	NDGA	90,8 ± 3,7
	Acido. Cafeico	92,3 ± 3,5
	Esculetina	88,3 ± 4,0

La ZF fue incubada por 90 min. en presencia o ausencia (control) de ACTH 10^{-10} M y homogeneizada, con las fracciones subcelulares obtenidas se realizó el ensayo de recombinación en presencia o no de BPB 10 nM, NDGA 0,5 μ M, ácido cafeico 5 μ M ó esculetina 10 μ M. La producción de P_4 fue determinada por RIE luego de ser extraída tal como se describe en métodos. (media ± DS, n=3, p<0,001)

descartar cualquier efecto colateral de los inhibidores sobre el Cit P450_{scc}, enzima encargada de la conversión de colesterol en P₅, o en el ensayo de recombinación.

Estudios anteriores (Neher y col, 1982) habían demostrado que el citosol obtenido a partir de glándulas adrenales provenientes de animales tratados *in vivo* con ACTH (pero no el que se obtiene de glándulas adrenales provenientes de animales controles) es capaz, cuando es recombinado con el sedimento de 105.000xg y mitocondrias de células adrenales controles, de producir un incremento en la síntesis de P₄ 10 veces mayor que el que se produce por recombinación del CSA con mitocondrias solamente, indicando (fig. 30) que diferentes factores esteroidogénicos deben estar presentes y cooperar para obtener una esteroidogénesis máxima.

Se decidió entonces, estudiar qué efecto tenían los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA en la activación de la fracción particulada control por acción del citosol proveniente de adrenales estimuladas con ACTH. Para ello, se ultracentrifugó el PMTS de glándulas adrenales sin tratamiento para obtener el CS y la fracción microsomal control (MP). Esta fue recombinada con el citosol de adrenales tratadas *in vitro* con ACTH y los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA. En la Tabla XII se observa que éstos nuevamente no pueden ejercer su efecto inhibitorio, ya que el factor final F₄ presente en el CSA tiene acción inmediata sobre el Cit P450, mientras que el efecto de los inhibidores se haría aparente sólo después de cierto tiempo. Además, cuando a partir de glándulas tratadas *in vitro* con ACTH se obtuvo el sedimento de 105.000xg (MPA) y éste fue recombinado simultáneamente con el citosol proveniente de glándulas controles, los inhibidores tampoco bloquearon la síntesis de P₄ (Tabla XIII), lo cual indicaría que una vez activada la fracción particulada la solubilización por el CS (F₃)

TABLA XII: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF por recombinación en el ensayo libre de células de fracciones particuladas de ZF adrenal sin tratamiento y citosol obtenido de ZF adrenal tratada *in vitro* con ACTH: efecto de los inhibidores.

Fracción particulada	Citosol	Inhibidor	progesterona (ng/adrenal)
MP	control	---	5,0 ± 0,3
		NDGA	4,8 ± 0,2
		BPB	5,5 ± 0,3
MP	ACTH	---	92,4 ± 4,8
		NDGA	91,2 ± 4,3
		BPB	93,6 ± 5,8

Las fracciones subcelulares obtenidas ya sea de adrenales sin tratamiento o tratadas *in vitro* con ACTH 10^{-10} M fueron recombinadas tal como se describe en métodos en presencia o ausencia de BPB 10 nM, NDGA 0,5 μ M. La producción de progesterona fue determinada por RIE. (media ± DS, n=3).

TABLA XIII: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF por recombinación en el ensayo libre de células de fracciones particuladas de ZF adrenal tratada *in vitro* con ACTH y citosol de ZF adrenal control: efecto de los inhibidores.

Fracción particulada	Citosol	Inhibidor	progesterona (ng/adrenal)
MP	CS	---	5,0 ± 0,3
		NDGA	4,8 ± 0,2
		BPB	5,5 ± 0,3
MPA	CS	---	156,5 ± 7,8
		NDGA	164,0 ± 7,8
		BPB	176,2 ± 7,3

Las fracciones subcelulares obtenidas ya sea de adrenales sin tratamiento o tratadas *in vitro* con 10^{-10} M ACTH fueron recombinadas tal como se describe en métodos en presencia o ausencia de BPB 10 nM, NDGA 0,5 μ M. La producción de progesterona fue determinada por RIE. (media \pm DS, n=3).

de la actividad allí presente (F_2 , fig. 30) no es inhibible y lleva a la activación mitocondrial, señalando una vez más que la acción de los inhibidores es específica para algunos pasos intermediarios de la esteroidogénesis.

Para estudiar el efecto de F_1 , la fracción particulada obtenida de adrenales controles fue incubada en presencia de los inhibidores y luego se agregó el citosol proveniente de células estimuladas con ACTH. El citosol fue incapaz de estimular la fracción particulada y consecuentemente la esteroidogénesis (Tabla XIV). Debe observarse que la inhibición lograda no es completa debido a que como ya se describió los inhibidores no son capaces de bloquear el factor 4 presente en el citosol proveniente de glándulas adrenales tratadas con ACTH.

Estos resultados sugieren que un incremento en la concentración de AA en el sobrenadante post-mitocondrial formaría parte del mecanismo por el cual ACTH desencadena la síntesis de esteroides y que el sitio de acción de los inhibidores ensayados es a nivel de la activación de las fracciones particuladas por un citosol proveniente de glándulas adrenales tratadas con ACTH, indicando posiblemente que en dicho citosol existe un activador para la liberación del AA y que las enzimas involucradas en la metabolización del AA se localizarían, luego de la homogeneización del tejido en la fracción particulada.

III-6: Estimulación de la esteroidogénesis en un sistema de recombinación *in vitro* por acción de ácido araquidónico.

Como se describió en la sección anterior, ACTH produciría un incremento en la concentración de AA en el PMTS; por lo tanto el AA agregado exógenamente en combinación con el PMTS no activado debería incrementar la síntesis mitocondrial de P_4 .

TABLA XIV: Producción neta de progesterona en mitocondrias de ZF por recombinación en el ensayo libre de células de fracciones particuladas de ZF adrenal sin tratamiento y citosol obtenido de ZF adrenal tratada *in vitro* con ACTH: efecto de la pre-incubación con los inhibidores.

Fracción particulada	Inhibidor	Citosol	progesterona (ng/adrenal)
MP	---	CS	5,5 ± 0,3
MP	---	CSA	82,5 ± 4,5***
	NDGA		12,1 ± 0,6
	BPB		11,7 ± 0,4
	Acido Cafeico		12,8 ± 0,3
	Esculetina		13,0 ± 0,4*

Glándulas adrenales controles fueron homogeneizadas y sometidas a fraccionamiento subcelular, las fracciones particuladas obtenidas se incubaron por 30 min. en presencia de BPB 10 nM, NDGA 0,5 μ M, ácido. cafeico 5 μ M, esculetina 10 μ M y posteriormente durante 7,5 min. con citosol obtenido a partir de glándulas tratadas *in vitro* con ACTH 10^{-10} M. Como control se utilizaron las fracciones particuladas incubadas durante 30 min. con medio A y posteriormente con citosol de glándulas controles. (media \pm DS, n=3), *p < 0,05, *** p < 0,001.

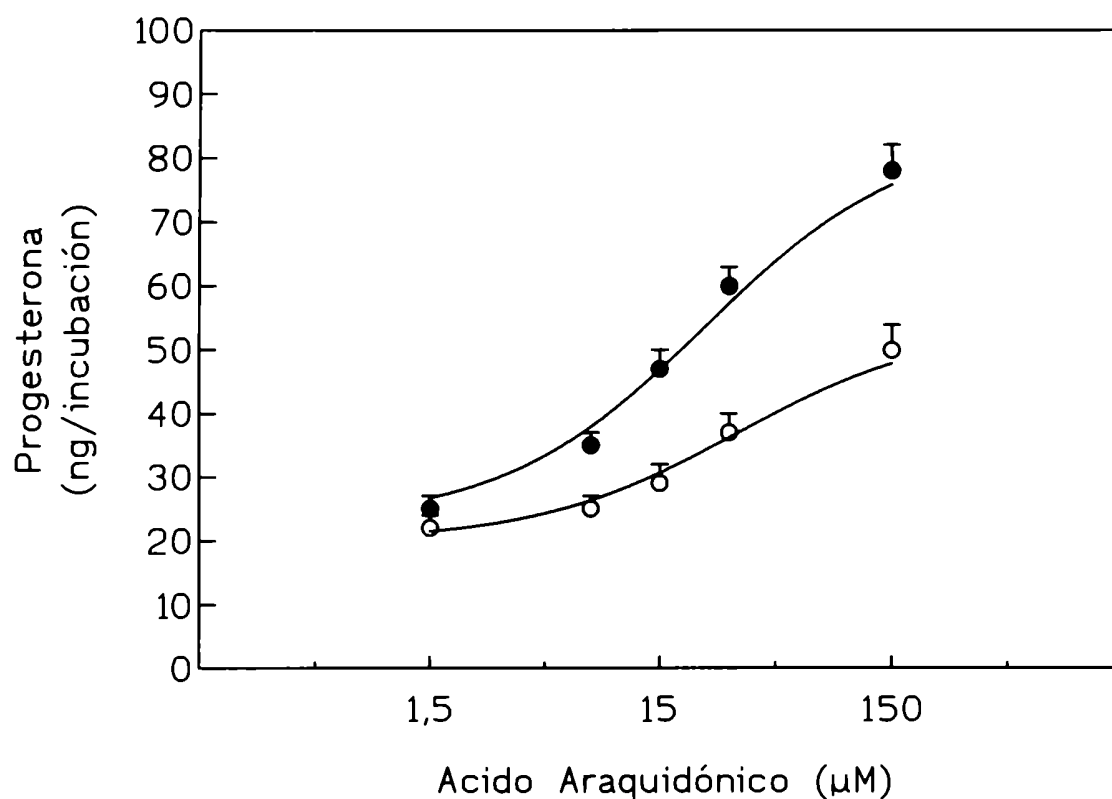
En la fig. 38 se muestra cómo el AA (1,5 a 150 μ M) es capaz de estimular de manera dosis dependiente la síntesis de P_4 en la mitocondria adrenal, en presencia del sedimento de 105.000xg y el CS. Además, la presencia de NDGA abolió el efecto del AA agregado exógenamente (fig. 38). En el mismo experimento las fracciones particuladas fueron pre-incubadas en presencia de BPB y posteriormente se realizó el ensayo de recombinación en presencia de AA y el CS. La curva obtenida en estas condiciones resultó superponible con la curva de AA que se muestra en la figura 38.

Es interesante aclarar que previamente y como control, el AA (en la mayor de las dosis utilizadas) fue incubado con mitocondrias aisladas de glándulas adrenales controles, obteniéndose los siguientes valores (ng P_4 / adrenal, n=2): mitocondrias : $10,2 \pm 1,1$, mitocondrias + 150 μ M AA : $12,0 \pm 0,9$; estos resultados permiten descartar cualquier efecto tóxico del AA sobre las mitocondrias, así como también un efecto estimulador directo del AA sobre la síntesis mitocondrial de esteroides, reafirmando el concepto que para producir estimulación el AA debe ser metabolizado.

Por otro lado, la producción de P_4 en el ensayo de recombinación tampoco parece deberse a efectos tóxicos del AA sobre algún otro componente del sistema, ya que ésta puede ser inhibida por el agregado de NDGA.

Estos experimentos demuestran claramente los siguientes puntos:

- a) El AA y sus metabolitos son intermediarios en la regulación hormonal de la esteroidogénesis.
- b) Estos metabolitos ejercen su función en sistemas AMPc dependientes.

FIGURA 38: Estimulación por AA de la biosíntesis mitocondrial de P₄

Mitocondrias aisladas de ZF de adrenales de rata se incubaron con AA en presencia del sedimento de 105.000xg y CS de glándulas no estimuladas. Los círculos abiertos representan las incubaciones en las cuales NDGA (5 μM) fue agregado 40 minutos antes del AA. Los valores son medias de duplicados de uno de tres experimentos independientes.

c) La fosforilación de proteínas por acción de la PKA es un paso anterior a la liberación de AA.

Con estos resultados se puede sugerir la presencia de una fosfoproteína citosólica que directa o indirectamente es necesaria para la activación de una PLA₂ encargada de la liberación de AA en tejidos esteroideogénicos.

Capítulo IV:

DISCUSION

El ACTH y la All son las principales hormonas que controlan *in vivo* la esteroidogénesis en la adrenal a través de dos mecanismos distintos. Los efectos de ACTH están principalmente mediados por AMP_c (Podestá y col, 1979b; Sala y col, 1979; Schimmer, 1980), mientras que los de All son ejercidos preponderantemente a través de la vía del fosfatidilinositol (Barret y col, 1988). ACTH *in vivo* e *in vitro* es capaz de incrementar la secreción de distintos glucocorticoides en ZF y de aldosterona en ZG, mientras que All en la mayoría de los mamíferos estimula sólo la secreción de aldosterona.

A pesar del diferente sistema de transducción generado en la membrana plasmática, el control de ambas hormonas sobre la síntesis de esteroides se ejerce principalmente sobre el transporte del colesterol hacia la membrana interna mitocondrial y su conversión a P₅. Debido al hecho que la ZG adrenal es blanco de las acciones de All y ACTH, las mitocondrias de estas células deberían tener dos mecanismos diferentes para regular dicho transporte. Sin embargo también es razonable postular que las mitocondrias respondan sólo a una señal y que los eventos desencadenados a nivel de membrana plasmática por All y ACTH converjan en algún punto.

De ser posible el segundo postulado, sería factible estimular las mitocondrias de la zona fasciculata de adrenal de rata con factores esteroidogénicos de la zona glomerulosa estimulada por All. Fue por ello que se procedió a desarrollar el ensayo de recombinación *in vitro* para la zona glomerulosa de la glándula adrenal. Se estimuló *in vitro* la síntesis de aldosterona y se pudieron aislar factores esteroidogénicos capaces de estimular las mitocondrias controles de ZG.

El ensayo desarrollado al igual que para la zona fasciculata de la corteza adrenal, mide la estimulación del paso enzimático limitante en la síntesis de esteroides, la conversión de colesterol en pregnenolona. Esta activación es validada por el hecho de que el contenido de P_4 en mitocondrias de ZG tratadas con AII fue mayor que el de las mitocondrias controles indicando que los efectos observados sobre la síntesis de aldosterona no ocurren solamente por la secreción de intermediarios posteriores al clivaje de la cadena lateral del colesterol, sino por un efecto sobre la síntesis de P_5 .

Los valores de P_4 alcanzados en la recombinación homóloga de ZG son del orden o mayores que los valores de aldosterona producidos por la incubación de igual cantidad de tejido con AII, sugiriendo que los factores esteroidogénicos producidos por la recombinación de fracciones subcelulares son equipotentes con la cascada de eventos disparada por la hormona en las células enteras. Los resultados obtenidos por la recombinación *in vitro* de factores esteroidogénicos aislados a partir de ZF o ZG tratada con ACTH permiten obtener las mismas conclusiones que las descriptas para AII.

Con el ensayo desarrollado se estudió la respuesta de las mitocondrias de zona fasciculata al estímulo de factores esteroidogénicos AII - dependientes. Esta estimulación heteróloga demostró que el tratamiento con AII de las células de ZG promueve la formación intracelular de factores esteroidogénicos capaces de estimular las mitocondrias de la ZF (blanco de los factores esteroidogénicos generados por ACTH) cuando son recombinados en el ensayo libre de células. Los valores de P_4 obtenidos en los experimentos de recombinación heteróloga son

similares a los obtenidos para All en ZG, indicando que la cantidad de factores esteroideogénicos producidos por All son limitantes en la producción de pregnenolona. Estos resultados son coincidentes con los estudios previos en ZF (Neher y col, 1982) que demostraban que la cantidad de mitocondrias agregada en el ensayo no era limitante para la medición de la neosíntesis de pregnenolona.

Como mencionamos anteriormente, teniendo en cuenta que All no produce estimulación de la síntesis de corticosterona en ZF de rata (Bell y col, 1981) y que en la ZG el tratamiento con All inhibe la formación de AMPc estimulada por ACTH (Woodcock y col, 1984), o sea que inhibe la formación de cualquier factor esteroideogénico ACTH-dependiente; los experimentos realizados demostrarían que a pesar que en la ZG operan dos mecanismos de transducción intracelular, que llevan a la producción de diferentes segundos mensajeros, los cuales a su vez activan distintas quinasas de proteínas, estos mecanismos podrían coincidir en algún punto de la cascada generando un intermediario común a ambos mecanismos, el cual lleva a la activación del paso limitante de la esteroideogénesis.

Esta hipótesis no sería suficiente ya que si bien no existe estimulación de la zona fasciculata de ratas por All (Bell y col, 1981), no puede descartarse la presencia de un mecanismo remanente como se encuentra en otras especies (Finn y col, 1988). Es por ello que es necesario demostrar la presencia de un intermediario común para All y ACTH formado luego de la activación de los sistemas de transducción de señales diferentes.

Dado el hecho que ACTH y All estimulan proteínas quinasas específicas y diferentes, la activación de esteroideogénesis debe requerir la fosforilación de una o

más proteínas específicas. Debido al hecho que la especificidad de sustrato para la PKA y la PKC son diferentes (House y col, 1987) parecería que diferentes proteínas son fosforiladas y que las vías esteroidogénicas en este punto aún están separadas. También debería considerarse la posibilidad de que ambas quinasas activen la misma proteína por fosforilación en sitios diferentes.

Se consideraron varios candidatos como el posible intermediario común, uno de ellos fue el Ca^{++} , ya que AII actúa promoviendo la liberación de Ca^{++} a través de depósitos intracelulares y que ACTH requiere de la presencia de Ca^{++} en varios pasos de su mecanismo de acción. A partir de los resultados obtenidos trabajando con ACTH en ZF (Neher y col, 1982) y los aquí presentados para AII en ZG utilizando quelantes de calcio, podría deducirse que los factores esteroidogénicos presentes en el PMTS pueden ejercer su acción estimuladora aún en ausencia de Ca^{++} . La concentración de los quelantes utilizada asegura que la concentración de Ca^{++} citosólica es cero aún luego del aumento de Ca^{++} intracelular producido por AII. Los valores de P_4 obtenidos en presencia de EDTA o EGTA y AII no son significativamente diferentes con respecto al valor con AII solamente, indicando que la presencia de Ca^{++} en el PMTS no es necesaria para la activación del clivaje de la cadena lateral del colesterol. Un reporte reciente (Python y col, 1995) sugiere que en células de ZG en las cuales el Ca^{++} citosólico libre se fijó con ionomicina, niveles de Ca^{++} de 50 a 860 nM incrementan la producción de pregnenolona y aldosterona, indicando que el Ca^{++} promovería el paso limitante de la síntesis de esteroides (Python y col, 1995). Sin embargo, a todas las concentraciones de Ca^{++} probadas la estimulación lograda es pequeña comparada con la que promueve la hormona y los

efectos del agregado conjunto de Ca^{++} y All, AMPc o forskolina fueron más que aditivos, sugiriendo que además de la acción del Ca^{++} se requieren factores All- o AMPc - dependientes para lograr la estimulación máxima de la esteroidogénesis (Python y col, 1995).

En mitocondrias aisladas de ZF el incremento en los niveles de Ca^{++} puede regular el metabolismo de colesterol exógeno y esto es similar a los efectos reportados previamente para el GTP (Kowluru y col, 1995). Así se sugiere que el Ca^{++} y el GTP pueden activar sitios de contacto entre la membrana mitocondrial interna y externa, lo cual facilitaría la transferencia de colesterol. También se ha postulado que la regulación del eflujo de Ca^{++} intramitocondrial es uno de los pasos regulatorios para la esteroidogénesis (Nishikawa y col, 1994). El conjunto de estos resultados podría sugerir que el mantenimiento de los niveles de Ca^{++} intramitocondrial es importante en la regulación del paso limitante de la esteroidogénesis y que las mitocondrias obtenidas para la realización del ensayo de recombinación tienen suficiente calcio como para permitir observar los efectos de ACTH y All a través de sus segundos mensajeros. Es por ello que el calcio como regulador esteroidogénico común a diferentes estímulos no puede ser descartado. Sin embargo no sería el intermediario común postulado en este trabajo debido a que los efectos esteroidogénicos observados en el sistema de recombinación *in vitro* son de una magnitud superior a los hallados para el calcio en células aisladas.

De la misma forma hemos considerado como intermediaria a una proteína denominada StAR (Clark y col, 1994) necesaria para la estimulación de la síntesis de esteroides, que se encuentra en todos los tejidos esteroidogénicos estudiados,

independientemente de la señal de transducción que se genere. StAR se sintetiza por estímulo hormonal y su función estaría a nivel de la transferencia de colesterol de la membrana externa a la interna (Lin y col, 1995). Esta proteína es necesaria pero no suficiente ya que además de su presencia se necesita de factores producidos por la cascada de eventos derivada de la acción de los segundos mensajeros para obtener la estimulación total de la esteroidogénesis (Clark y col, 1994).

El otro intermediario posible discutido fue el ácido araquidónico. Se consideró la posibilidad de este compuesto como intermediario ya que un número creciente de evidencias sugería que además de los conocidos efectos sobre el recambio del fosfatidilinositol, AII podía liberar AA (Kojima y col, 1985e; Nadler y col, 1987; Natajara y col, 1988; Antonipillai y col, 1989; Campbell y col, 1991). Se estudió la posibilidad de que ACTH vía AMPc utilizara al AA como intermediario en su mecanismo de acción.

Los resultados aquí presentados proveen evidencias que indicarían que el AA tiene un rol también en la regulación de la síntesis de esteroides por ACTH. Más aún, en células de Leydig en las cuales la hormona luteinizante estimula la síntesis de esteroides utilizando como segundo mensajero al AMPc, también hemos podido demostrar un rol para el AA. Los resultados presentados demuestran que el AA cumple con todos los requisitos que se postulan para determinar si una sustancia puede ser intermediaria en la acción de una hormona:

1º: Los inhibidores de la liberación del AA por acción de la PLA_2 anulan los efectos de ACTH y LH sobre la secreción de corticosterona y testosterona

respectivamente. Esto se observa también cuando las células adrenales y de Leydig son estimuladas con db-AMPC. Los inhibidores de la PLA_2 anulan la activación por el CS-hormono dependiente de la fracción microsomal y la síntesis de P_4 en el ensayo de recombinación.

2º: El AA agregado exógenamente estimula la producción de corticosterona y testosterona en células aisladas de ZF adrenal y de Leydig respectivamente, y de P_4 en el ensayo de recombinación.

3º: El agregado de AA revierte el efecto de los inhibidores de la PLA_2 tanto en células aisladas como en el ensayo de recombinación.

4º: ACTH promueve la liberación de AA endógeno a partir de células adrenales.

La PLA_2 provee AA por desacilación directa de los fosfolípidos. Sin embargo el AA también puede ser liberado de los fosfolípidos por acción secuencial de la PLC y la diacilglicerol lipasa independientemente de la acción de la PLA_2 . Si bien existe un reporte previo en que se describe que ACTH estimula la producción de DG (Farese y col, 1987), los resultados demostraron que tanto quinacrina como BPB (inhibidores específicos de la PLA_2) bloquean la producción de esteroides estimulada por ACTH en células de ZF y por LH en células de Leydig y que este efecto puede ser revertido por la estimulación con AA. Esto sugiere que la PLA_2 es la enzima responsable de la estimulación inducida por la hormona del clivaje hidrolítico en la posición sn-2 de los fosfolípidos.

Cuando se trabaja con inhibidores es muy difícil descartar efectos colaterales, tóxicos o inespecíficos sobre los parámetros estudiados. Los datos de

viabilidad celular en presencia de los inhibidores y los obtenidos luego de una tinción funcional no ofrecen diferencias entre las células tratadas con los inhibidores y las controles. Más aún los resultados observados en el ensayo libre de células sugieren que BPB no presenta efectos tóxicos sobre las mitocondrias en las concentraciones utilizadas, ya que cuando el inhibidor fue agregado simultáneamente con las demás fracciones subcelulares se observó la misma estimulación que en su ausencia. Además, en los experimentos utilizando el ensayo libre de células fue posible observar la inhibición de un paso determinado y al igual que en células intactas esta inhibición pudo ser revertida por el agregado de AA. Estos resultados nos permitirían sugerir que los efectos de los inhibidores no serían inespecíficos.

Las dosis de BPB y quinacrina utilizadas fueron similares a las descriptas en la bibliografía (Hunyady y col, 1985 y Kojima y col, 1985e, Abayasekara y col, 1990).

El hecho de que la producción de corticosterona y testosterona estimulada por db-AMPC sea inhibida también por ambos inhibidores apoya el concepto que otros intermediarios además del AMPC son necesarios para estimular la síntesis de esteroides. Las dosis necesarias para inhibir la esteroidogénesis dependiente de AMPC fueron las mismas que las necesarias para bloquear el efecto de las hormonas tróficas. Estos resultados indicarían que la activación de la PLA₂ en células de ZF o de Leydig es un evento mediado por AMPC. Esto sugiere que el AMPC por sí mismo puede modular a otros mensajeros intracelulares. Como se descripto en la introducción el AMPC puede modular los niveles intracelulares de

Ca^{++} (Sullivan y Cooke, 1986), sería factible que los niveles aumentados de Ca^{++} modulen la actividad de la PLA_2 y subsecuentemente la liberación de AA, que es el paso limitante para la síntesis de eicosanoides. Por otro lado, la fosforilación de proteínas AMPc dependiente puede modular la actividad de una proteína reguladora de la PLA_2 .

El AA puede ser metabolizado para producir prostaglandinas, endoperóxidos o leucotrienos. Nuestros estudios indicarían que los productos de metabolización por las lipoxigenasas serían los responsables del estímulo hormonal.

Dada la baja especificidad de la mayoría de los inhibidores de la LO disponibles fue necesario estudiar el efecto de diferentes drogas. Los resultados obtenidos utilizando cuatro inhibidores diferentes de la LO (NDGA; ETYA, ácido cafeico y esculetina) demostraron que todos ellos son capaces de inhibir la esteroidogénesis estimulada por ACTH o LH tanto en un sistema de incubación estático como en el ensayo de recombinación.

Las dosis medias de NDGA, ácido cafeico y esculetina necesarias para inhibir la producción de corticosterona estimulada por ACTH y AMPc, o de testosterona estimulada por LH y AMPc están de acuerdo con las dosis reportadas en la bibliografía para la acción de estos inhibidores (Kojima y col 1985e, Jones y col, 1987). Aunque es de destacar que la presencia de ETYA aún en la dosis máxima probadas no inhibió totalmente la producción de testosterona estimulada por AMPc y que el perfil de inhibición observado es distinto cuando se estimula con LH o con un análogo permeable del AMPc. Este estudio demuestra que los niveles aumentados de AMPc solamente no son suficientes para inducir un incremento en

la síntesis de esteroides indicando un rol para los productos derivados de la acción de la PLA₂ y la LO como mensajeros adicionales en la acción de ACTH y LH.

Al igual que lo descrito para los inhibidores de la liberación de AA, parece poco probable que las inhibiciones observadas sean el resultado de efectos tóxicos de estos compuestos dado que no se observó alteración sobre la viabilidad ni funcionalidad celular y que en el ensayo libre de células es posible observar estimulación en presencia de los inhibidores cuando los productos lipoxigenados ya están formados, descartando una acción directa de los inhibidores sobre la mitocondria y resaltando que solo actúan cuando se estimula la liberación de ácido araquidónico o cuando se coloca ácido araquidónico exógeno.

Más aún parece poco probable que varias sustancias estructuralmente no relacionadas coincidentemente compartan tal efecto secundario, salvo que este efecto sea también atribuible a la inhibición de la lipoxigenasa. La explicación más directa es que NDGA, ETYA, ácido cafeico y esculetina, por su capacidad común de inhibir la LO, interfieran con un paso común obligatorio en la secuencia que lleva al acople entre el estímulo y la respuesta y apoyaría el concepto de que la metabolización del AA por la vía de las LO contribuye a los complejos mecanismos que tienen lugar en los sistemas de transducción en las células adrenales y en células de Leydig.

Es importante enfatizar que los efectos de los inhibidores de la liberación y metabolismo del AA en células enteras y en el sistema libre de células pudieron ser observados sólo cuando los inhibidores estuvieron presentes por lo menos durante 30 minutos antes de la estimulación de las células adrenales y de células de Leydig

o de la activación de la fracción particulada por el citosol tratado. Esta observación está de acuerdo con un reporte previo en la zona glomerulosa de la corteza adrenal en el cual BW755C, un inhibidor del metabolismo del AA, comienza a ejercer su efecto inhibitorio sólo después de 20 minutos (Kojima y col 1985e).

A pesar que la identificación de los metabolitos derivados del AA por la vía de las LO no ha sido clarificada por nuestros estudios, y dado que ellos juegan un rol en diferentes mecanismos de transducción de señales intracelulares, se podría sugerir que un incremento en la movilización del AA es un concomitante general de la regulación hormonal. El hecho de que el ácido cafeico sea capaz de inhibir la esteroidogénesis en células adrenales y de Leydig parecería sugerir que en estas células la 5-LO sería la responsable de la metabolización del AA que lleva a la activación de la síntesis de esteroides.

De la evaluación de los resultados puede deducirse que la participación de los productos lipoxigenados es posterior a la producción de AMPc y cercana a la conversión de colesterol en P_5 . Esto está avalado por el hecho que el citosol hormono-dependiente, en el cual se encuentra presente el producto de la acción de la PKA, fue incapaz de transferir su activación a la fracción particulada pre-incubada con los inhibidores. Más aún, el sobrenadante post-mitocondrial obtenido por fraccionamiento subcelular de glándulas adrenales incubadas en presencia de los inhibidores y la hormona, fue incapaz de producir la transformación de colesterol en P_5 en el ensayo libre de células, sugiriendo nuevamente que la acción de los inhibidores se halla en un paso anterior al paso limitante de la esteroidogénesis.

La inhibición por BPB sobre la conversión de colesterol a P_4 en el ensayo libre de células es revertida por el agregado exógeno de AA. El NDGA bloqueó el efecto del AA en la ZF adrenal, y el AA en ausencia del residuo de centrifugación de 105.000xg no tuvo efecto, apoyando el concepto de que el AA debe ser metabolizado para ser efectivo. La reversibilidad del efecto observado y la necesidad de que esté presente la fracción microsomal sirven para descartar cualquier efecto tóxico del AA sobre las mitocondrias adrenales.

De los resultados obtenidos podría sugerirse que los metabolitos de la acción de LO juegan un rol en la esteroidogénesis, tal vez estimulando el transporte de colesterol o de sus ésteres hacia la mitocondria.

Pese al hecho de que las diferentes fracciones subcelulares utilizadas no han sido totalmente caracterizadas, los experimentos de reconstitución demuestran que ellas contienen los componentes necesarios para la estimulación del paso limitante en la biosíntesis de esteroides. Así a pesar de que la localización subcelular exacta deba ser aún establecida con mayor rigurosidad, de los resultados aquí presentados podemos concluir que tanto la PLA_2 como la LO se encontrarían en el residuo de 105.000xg, el cual contiene lisosomas, membranas plasmáticas y microsomas. Estos resultados están en concordancia con la descripción en zona fasciculata adrenal de una PLA_2 presente en el residuo de 19000xg la cual presenta escasa actividad en la fracción particulada control y que se incrementa en un 170% en la fracción particulada de células tratadas con ACTH (Laychock y col, 1977). En coincidencia, en estos experimentos la actividad de PLA_2 disminuyó en la fracción soluble de las adrenales tratadas.

En la ZF, Hirai y col (Hirai y col, 1985) han detectado la presencia de dos productos de la LO: el LTB₄ y el 5-HETE. Sin embargo hasta el momento no existe ningún reporte acerca de su localización subcelular. La presencia de una 5-LO involucrada en la síntesis de esteroides en células de la ZF fue además reafirmada por el hecho que el AA861, un inhibidor específico de la LO, reducía simultáneamente la síntesis de 5-HETE, LTB₄ y de corticosterona sugiriendo que los productos intermediarios inestables (5-HPETE y LTA₄) podrían ser formados en células adrenocorticales (Mikami y col, 1990). Esta posibilidad es también apoyada por la presencia de dos trans isómeros del LTB₄, los cuales se propone que se forman no enzimáticamente por hidrólisis del LTA₄. En concordancia con lo descrito en este trabajo se ha sugerido que el 5-HPETE podría actuar a nivel mitocondrial en la esteroidogénesis estimulada por ACTH en células de corteza adrenal (Mikami y col, 1990). Estudios recientes indican que el 5-HETE activaría el clivaje de la cadena lateral del colesterol para producir P₅ en mitocondrias enteras pero no en la membrana mitocondrial interna (Nishikawa y col, 1994). Esto significaría que el 5-HETE induciría la traslocación del colesterol de la membrana externa a la interna. Los HETEs también activan el eflujo de calcio mitocondrial a partir de mitocondrias aisladas. Esto sugeriría que existe una correlación entre la activación del clivaje de la cadena lateral del colesterol y el eflujo de calcio mitocondrial (Nishikawa y col, 1994). Estos datos están de acuerdo con la activación observada en el ensayo libre de células aún en ausencia de calcio.

Estudios similares sugiriendo un rol para los productos de la metabolización del AA en el acople entre el estímulo y la respuesta han sido llevados a cabo por

Metz y col (Metz y col, 1983) en las células β del páncreas utilizando insulina como estímulo; para la liberación de LH por el factor liberador de gonadotrofinas en células pituitarias (Naor y col, 1985) y para la liberación de ACTH de cultivos celulares de pituitaria anterior (Abou Samra y col, 1986; Cowell y col, 1991).

Sullivan y col (Sullivan y Cooke, 1985) demuestran que en células de Leydig la producción de LTB_4 no es requerida para la estimulación de la esteroidogénesis y sugieren que el AA puede ser metabolizado principalmente a los productos anteriores en la vía, esto es: 5 y 12 HETE.

En el caso de la acción de AII, Nadler y col (Nadler y col, 1987) sugieren que el mayor producto formado luego de la acción hormonal es el 12-hidroxieicosatetraenoico, formado por acción de la 12-LO y no aquellos metabolitos producidos por la acción de la 5-LO. Los datos obtenidos por estos autores sugieren que la activación de la vía de la LO en la ZG adrenal contribuye a los cambios en el calcio citosólico actuando sobre los depósitos de calcio intracelular más que a través del influjo de calcio (Stern y col, 1993). Esto se basó en la observación de que los inhibidores de la LO bloquean la señal de Ca^{++} inducida por AII y que la adición de 12-HETE revierte este efecto.

La estimulación de la síntesis de esteroides pudo lograrse también por el agregado exógeno de AA a células aisladas de ZF y a células de Leydig. El incremento en la liberación de testosterona y corticosterona inducida por ácido araquidónico 100 μM es de aproximadamente el 30% de la que se obtiene con la hormona en dosis máximas y un aumento en la concentración de AA no produce mayor estimulación. Resultados similares fueron reportados para células aisladas

de ZG. Este hecho puede probablemente estar relacionado con la captación de AA por las células ya que el incremento en la concentración de AA no permite llegar al nivel de estimulación obtenido por la hormona. Este concepto es apoyado por el hecho de que en el sistema libre de células la estimulación con AA incrementa la producción de P_4 a niveles comparables con los obtenidos con el citosol-hormono dependiente.

La estimulación de las células de Leydig y de adrenal se realiza en presencia de BSA y el hecho de que las dosis de AA necesarias para producir estimulación se hallan en el orden del micromolar, probablemente se deba a la unión del ácido graso a la BSA presente en el medio de incubación, lo cual implicaría que la concentración de AA libre en el medio es menor. De hecho se ha mostrado que la DE_{50} requerida para la liberación de LH por AA en células de la pituitaria anterior se reduce en un orden de magnitud cuando se omite la BSA del medio de incubación (Naor y col, 1985); pero en los experimentos aquí descritos no es posible omitir la BSA del medio de incubación.

En condiciones similares a las mostradas en este trabajo Didolkar y Sundaram (Didolkar y Sundaram, 1987) reportan que el AA hasta $100 \mu M$ incrementa la producción de testosterona en células de Leydig y que dosis de $200 \mu M$ no aumentaron la estimulación, la cual era aproximadamente del 10% de la lograda por dosis máximas de hCG. Estudios similares fueron reportados por Romanelli y col (Romanelli y col, 1995). En cultivos de pituitaria anterior $100 \mu M$ de AA estimula la liberación de ACTH en un 50% con respecto a los valores

alcanzados en presencia del factor liberador de corticotrofina (CRF) (Abou Samra y col, 1986).

En células de ZG el agregado de 12-HETE produce un aumento de entre 20-50% por sobre la producción basal de aldosterona (Stern y col, 1993), aunque los inhibidores de las LO bloquean totalmente la respuesta a AII (Kojima y col, 1985e).

El AA agregado exógenamente revirtió el bloqueo producido por BPB en la estimulación de la esteroidogénesis inducida por ACTH o db-AMP_c sugiriendo nuevamente el rol de la PLA₂ en la estimulación de la esteroidogénesis y la ausencia de cualquier efecto adverso de este inhibidor sobre la síntesis de esteroides. Los niveles de corticosterona alcanzados son comparables a los obtenidos con AA solo.

La estimulación con ACTH de células adrenales resulta en la liberación de AA y la mayor fuente de AA es el ácido fosfatídico y no otros fosfolípidos.

Sin embargo, debe tenerse en cuenta que: i) las reacciones de reacilación de los fosfolípidos deacilados puede oscurecer la contribución de un determinado fosfolípido y que la acumulación de lisofosfolípidos solamente refleja el grado en que la reacilación no está compensada por la deacilación; ii) en algunos tejidos un fosfolípido particular puede tomar tanto AA marcado que, aún si hiciera la mayor contribución de AA marcado la pérdida podría no ser detectable por sobre el error experimental.

Estudios previos (Schrey y Rubin, 1979) muestran una pérdida inducida por ACTH en ³H-fosfatidilinositol a partir de fosfolípidos pre-marcados con ³H-AA en presencia de ACTH, la cual contrasta con la incapacidad de ACTH para promover

una pérdida de AA a partir de PI en células pre-marcadas con AA en ausencia de ACTH. Las bases para esta disparidad podrían residir en las diferencias relativas de la distribución del AA marcado en los varios depósitos de fosfatidilinositol pre-marcados en presencia y en ausencia de la hormona. Esto implica que en la corteza adrenal existe una compartimentalización de los depósitos intracelulares de PI. La existencia de tales depósitos podría ser una función de la vía de metabolización del PI (síntesis *de novo* y deacilación-reacilación), estas dos vías podrían tener diferentes *loci* intracelulares y estar diferencialmente sujetas al control por ACTH.

De lo descripto hasta aquí puede deducirse que la liberación del AA en las células esteroideogénicas es un paso obligatorio mediado por AMPc y anterior a la transformación de colesterol en pregnenolona. El hecho de que esta liberación sea mediada por AMPc implica que en los pasos que llevan a la activación de la PLA₂ existe un evento de fosforilación. Estas conclusiones están avaladas por los estudios realizados con las células Y₁. En las células Y1(kin⁻) no fue posible generar factores esteroideogénicos en el sobrenadante post-mitocondrial ya sea que las células se trataran con ACTH o AMPc. Como estas células presentan una mutación en la subunidad reguladora de la PKA tipo I que impide la unión del AMPc y la liberación de la subunidad catalítica, estos experimentos nos llevaron a concluir que la activación del PMTS depende de un evento de fosforilación. Estos resultados se confirmaron con los experimentos en los cuales fue posible transformar un citosol control en activo luego de la incubación con AMPc o AMPc + PKA; este proceso se bloquea en presencia del inhibidor de PKA. Las dosis descriptas de PKI para bloquear completamente el efecto de la PKA y la de AMPc para estimular la PKA

estuvieron ambas en el orden de las reportadas en la bibliografía. Además, estos resultados sugieren fuertemente que la activación de la quinasa y la fosforilación necesaria para estimular el paso limitante de la esteroidogénesis están restringidas al compartimento soluble; esto fue confirmado también por el hecho de que el agregado de AMPc + PKA a la fracción microsomal no es capaz de estimular la síntesis de esteroides en el ensayo de recombinación.

Es poco probable que el factor citosólico represente la subunidad catalítica libre de la quinasa AMPc dependiente o la quinasa autofosforilada, debido a que la quinasa en presencia de AMPc pero en ausencia de citosol de glándulas adrenales no es capaz de estimular la síntesis de esteroides en mitocondrias aisladas.

Con respecto a la fosforilación de la proteína StAR, de las cuatro isoformas observadas, las dos formas más acídicas corresponden a formas fosforiladas; esta fosforilación ocurriría dentro de la mitocondria (King y col, 1995). Se ha demostrado previamente (Stocco y Sodeman 1991, Epstein y Orme-Johnson 1991) que las cuatro formas de la proteína StAR son estables y presumiblemente inertes, permaneciendo en la mitocondria por un largo período luego que la esteroidogénesis ha concluido, por lo tanto la significación de esta fosforilación para la actividad funcional de la StAR permanece poco clara.

La función de la fosforilación citosólica es poco clara aún. El efecto inhibitorio del BPB sobre la estimulación mediada por el citosol hormono - dependiente del residuo de 105.000xg sugeriría que el factor en el citosol puede estar involucrado en la liberación de AA. El hecho de que el inhibidor de la liberación de AA pueda bloquear la activación de la fracción microsomal y la síntesis de esteroides sugeriría

que la fosfoproteína formada en el citosol podría ser un activador directo o indirecto de la PLA₂.

Se ha postulado que varios mecanismos están involucrados en la activación de la PLA₂, incluyendo la disponibilidad de calcio intracelular (Van der Bosch, 1980), la activación de la PKC (Qiu y col, 1993), activación de la PKA (Piomelli y Greengard, 1991), activación de tirosinas quinasas (Goldberg y col, 1990), acoplamiento a nucleótidos de guanina (Gupta y col, 1990), y proteínas regulatorias negativas (Blackwell y col, 1980) o positivas (Clark y col, 1987). Sin embargo la regulación de las PLA₂ específicas es poco comprendida, ya que en la mayoría de los estudios que tratan sobre la regulación de la liberación de AA, las propiedades de la PLA₂ involucrada no han sido aún caracterizadas. En macrófagos se ha demostrado que diferentes estímulos involucrados en la activación de la PLA₂, los estímulos que promueven la liberación de AA también inducen la fosforilación y activación de la PLA₂ de 85 kDa (Qiu y col, 1993).

En concordancia con nuestros resultados, utilizando sinaptosomas lisados Piomelli y Greengard (Piomelli y Greengard, 1991) encontraron que la PKA y la caseína quinasa II regularían la acción de la PLA₂. Además, estos autores sugieren que en sus experimentos la falta de efecto de la PKA sobre membranas sinaptosomales aisladas sugiere que esta proteína quinasa podría actuar estimulando la fosforilación de una proteína citosólica moduladora de la actividad de la PLA₂. También, Wightman y col (Wightman y col, 1982) encontraron que la subunidad catalítica de la PKA incrementa la actividad de la PLA₂ en un lisado de macrófagos peritoneales.

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que la estimulación de la PLA₂, la liberación de AA y su metabolización a productos lipoxigenados son procesos involucrados en la regulación hormonal de la síntesis de esteroides. Estos intermediarios estimularían el paso limitante de la esteroidogénesis: el transporte de colesterol hacia la membrana interna mitocondrial, vía la activación a nivel de membrana plasmática de diferentes sistemas de transducción de mensajes.

La activación de receptores de hormonas proteicas lleva a la fosforilación de proteínas. Los resultados indicarían que la activación de la PLA₂ en ZF adrenal ocurre posteriormente a la acción de la PKA sugiriendo que su activación es mediada por la fosforilación de proteínas específicas. En el caso de la estimulación de la síntesis de esteroides estas proteínas se encontrarían luego del fraccionamiento subcelular en la fracción soluble. El hallazgo de este sustrato abriría un amplio campo en el estudio de la regulación de la PLA₂ por fosforilación.

Capítulo V:
BIBLIOGRAFIA

- Abayasekara D., Band A. y Cooke B. 1990. Mol and Cell Endocrinology 70:147-153.
- Abou-Samra A., Catt K. y Aguilera G. 1986. Endocrinology 119: 1427-1431.
- Aguilera G. y Catt K. 1979. Endocrinology 104: 1046-1052.
- Aguilera G. y Catt K. 1983. J. Steroid Biochem. 19:525-531.
- Aguilera G. y Catt K. 1986. Endocrinology 118: 112-118.
- Aguilera G., Parker D., y Catt K. 1982. Endocrinology 111: 1376-1384.
- Alberta J., Epstein L., Pon L. y Orme-Johnson N. 1989. J. Biol. Chem. 264: 1942-1948.
- Antonipillai I., Horton R., Natarajan R. y Nadler J. 1989. Endocrinology 125: 2028-2034.
- Arnold J. 1866. Arch. Pathol. Physiol. Klin. Med. 35: 64-107.
- Ascoli M., Pignataro O., y Segaloff D. 1989. J. Biol. Chem. 264: 6674-6681.
- Ascoli M. y Segaloff D. 1989. Endocr. Rev. 10:27-44.
- Axelrod J., Burch R., y Jeselma C. 1988. Trends in Neurosci. 11:117-123.
- Axelrod J. 1990. Biochem. Society Transaction 18: 503-507.
- Barrett P., Bollag W y Rasmussen H. 1988. Hormones and their actions. part II Elsevier Science Publishers. B. V. pag: 211-229.
- Beall R. y Sayers G. 1972. Arch. Biochem. Biophys. 148: 70-76.
- Beckett G. y Boyd G. 1977. Eur. J. Biochem. 72: 223-233.
- Billheimer J., Strrhl L., Davis G., y Stauss J.III. 1990. 32:567-572.
- Bell R., Kennerly D., Standford N. y Majerus P. 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 3238-3241.
- Bell J., Tait J., Tait S., Barnes G. y Brown B. 1981. J. of Endocrinol. 91: 145-154
- Berridge M. 1983 Biochem. J. 212: 849 -858.

- Billah M., Lapetina E. y Cuatrecasas P. 1981. J. biol. Chem. 256:5399-5403.
- Bing R. y Schulster D. 1977. J. Endocrinology. 74: 261-272.
- Birmingham M., Kurlents E., Lane R., Muhlstock B. y Traikov H. 1960. Can. J. Biochem. 38: 1077-1085.
- Blackwell G., Crunuccio R., Di Rosa R., Flower R., Parente I. y Persico P. 1980. Nature 287: 147-149.
- Borkowsky A., Levin S., Delcrois C., Mahler A. y Verhas V. 1967. J. Clin. Invest. 46: 797-811.
- Brown A., Hall P. Shoyab M, Papadopoulos V. 1992. Mol Cell Endocrinol 83: 1-9.
- Boujrad N., Gaillard J., Garnier M., y Papadopoulos V. 1994. Endocrinology 135: 1576-1583.
- Boyd G. y Trzeciak W. 1973. Ann. N. Y. Acad. Sci. 212: 361-377.
- Braley L., Williams G. 1977. Am. J. Physiol. 233: E 402-406.
- Burgoyne R. y Morgan A. 1990. TIBS 10: 365-366.
- Burnay M., Python C., Vallotton M., Capponi A. y Rossier M. 1994. Endocrinology 135: 751-758.
- Campbell W., Brady M. y Gomez Sanchez C. 1986. J. Steroid Biochem. 24: 865-870.
- Campbell W., Brady M., Rosolowsky L. y Falck J. 1991. Endocrinology 128: 2183-2194.
- Campbell W. y Gomez Sanchez C. 1985. Endocrinology 117: 279-286.
- Campbell W., Gomez Sanchez C y Adams B. 1980. Hypertension 2: 471-476.
- Capponi A., Lew P. , Jornot L. y Vallotton M. 1984. J. Biol. Chem. 259: 8863-8869.
- Capponi A., Python C. y Rossier M. 1994. Endocrine. 2:579-586.

- Capponi A., Rossier M., Davies E., y Vallotton M. 1988. J. Biol. Chem. 263: 16113-16117.
- Catt K., Dufau M., Tsuruhara T. 1972 J. Clin. Endocrinol. 34: 123-132.
- Cavallaro S., Korneyev A., Guidotti A., Costa E. 1992. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 89: 10598-10602.
- Cavallaro, S., Pani, L., Guidotti, A., Costa, E. 1993 Life Sci. 53: 1137-1147.
- Clark M., Conway T., Shorr R., y Crooke S. 1987. J. Biol. Chem. 262: 4402-4406.
- Clark B., Wells J., Steven R y Stocco D. 1994 J. Biol. Chem. 269: 28314-28322.
- Connor J., Cornwall M. Williams G. 1987. J. Biol. Chem. 262: 2919-2927.
- Cooke B., Lindh L., y Janszen F. 1976. Biochem. J. 160: 439-446.
- Cooke B., Dix C., Habberfield A. y Sullivan M. 1987. Biochem. Soc. Trans 15: 26-28.
- Cowell A., Flower R. y Buckingham J. 1991. J. of Endocrinology 130:21-32.
- Crouch y Lapetina E. 1986. Biochem. Biophys. Res. Commun. 121 459-468.
- Crivello J., y Jefcoate C. 1980. J. Biol. Chem. 255: 8144-8155.
- Chanderbhan R., Hodges V., Treadwell C. y Vahouny G. 1979. J. Lipid Res. 20: 116-124.
- Christensen A. 1975. En Handbook of Physiology (Greep R. y Astwood E. editores). Section 7, 5: 57-94. American Physiological Society, Washington.
- Dennis E. 1994. J. Biol. Chem. 269: 13057-13060.
- Deviller P., Vallier P. y Saez J. 1987. Endocrine Research 13:123-142.
- Didolkar, A. y Sundaram, K. 1987. Life Sciences 41: 471-477.
- Dix C., Habberfield A., Sullivan M. y Cooke B. 1984. J. Biochem. 219: 529-537.
- Doherty P., Tsao J, Schimmer B. (1982). J. Biol. Chem. 257: 5877-5883.
- Dufau M. 1988. Ann. Rev. Physiol. 50: 483-508
- Dufau M., Catt K. y Tsuruhara T. 1972. Endocrinology 90:1032-1034.

- Dufau M., Baukal A., Catt K. 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. 77:5837-5841.
- Eik-Nes K. 1975. En Handbook of Physiology (Greep R. y Astwood E. editores). Section 7, 5: 95-115. American Physiological Society, Washington.
- Elliot M., Siegel F., Hadfokas N. y Goodfriend T. 1985. Endocrinology 116:1051-1059.
- Elliott M., Goodfriend T., y Jefcoate C. 1993. Endocrinology 133:1669-1677.
- Elton T., Stephan C., Taylor G., Kimball M., Martin M., Durand J. y Oparil S. 1992. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184:1067-1073.
- Enyedi P., Buki B., Musci R., y Spat A. 1985. Mol. Cell. Endocrinol 41: 105-112.
- Enyedi P., Spat A., Antoni F. 1981. Endocrinology. 91: 427-431.
- Epstein L. y Orme-Johnson N. 1991. J. Biol. Chem 266: 19739-19745.
- Exton J. 1990. J. Biol. Chem. 265: 1-4.
- Fain J., Wallace M. y Wojcikiewicz R. 1988. FASEB J. 2: 2569-2574.
- Fakunding J., Chow R. y Catt K. 1979. Endocrinology 105: 327-333.
- Fakunding J. y Catt K. 1980. Endocrinology 107: 1345-1353.
- Farese R., Larson R Y Davis J. 1984. Endocrinology 114: 302-304.
- Farese R., Fanjul L. Ruiz Galarreta, Davis J., Cooper D. 1987. Life Sci. 41: 2631-2637.
- Fawcett D. 1975. En Handbook of Physiology (Greep R. y Astwood E. editores). Section 7, 5: 21-55. American Physiological Society, Washington.
- Ferguson J. 1963. J. Biol. Chem. 238: 2754-2759.
- Finn F., Johns P., Nishi N. y Hofman K. 1976. J. Biol. Chem. 251: 3576-3585.
- Finn F., Stehle C., Ricci P. y Hoffman K. 1988. Archives of Biochemistry and Biophysics 264: 160-167.
- Foster R., Rasmussen H. 1983 Ann. J. Physiol 248 E281-E287

- Fujino M., Hatahaka C. y Nishimura O. 1972. Chem. Pharm. Bull. 19: 1006-1068.
- Fuse I., Iwanaga T. y Tai H. 1989. J. Biol. Chem. 264: 3890-3895.
- Garbus J., De Luca H., Looman M., y Strong F. 1963. J. Biol. Chem. 238:59-63.
- Garren L y Gill G. 1970. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39: 335-343
- Gill G. III C. Simonium M. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5569-5574.
- Goldberg H., Viegas M., Margolis B., Schlessinger J. y Skorecki K. (1990). Biochem. J. 267: 461-465.
- Goodfriend T. y Peach M. 1975. Circ.Res 36,37: 138-148
- Grahame-Smith D., Bulcher R., Ney R. y Sutherland E. 1967. J. Biol. Chem. 242: 5535-5541.
- Griendling K., Rittenhouse S., Brock T., Ekstein L., Grimbone M. Jr y Alexander R. 1986. J. Biol. Chem. 261: 5901-5906
- Gupta S., Diez E., Heasley I., Osawa S. y Johnson G. (1990). Science 249: 662-666.
- Habenicht A., Salbach P., Goerig M., Zeh W., Janssen-Timmen U., Blattner C., King W. y Glomset J. 1990. Nature 345: 634-636.
- Haberman E. (1972). Science 117:413-422.
- Halkerston I., Feinstein M. y Hechler O. 1966. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 122: 896-900.
- Hall P., Charpponier C. Nakamura M., y Gabbiani G. 1979. J. biol Chem254: 9080-9084.
- Hall P., Osawa S. y Thomason C. 1981. J. Biol. Chem. 90: 402-408.
- Hamberg M. y Samuelsson B. 1974. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 71: 3400-3404.
- Hamberg M. 1976. Biochem. Biophys. Acta 431: 651-654.

- Hausdorff W., Sekura R., Aguilera G. y Catt K. 1987. *Endocrinology*. 120:1668-1678.
- Haynes R. Jr., Koritz S. y Peron F. 1959. *J. Biol. Chem.* 234: 1421-1423.
- Hechler O., Bar H., Matsuba M. y Soifer D. 1969. *Life Sci.* 8: 935-942.
- Heinrikson R., Kruger E., y Keim P. 1977. *J. Biol. Chem.* 252: 4913-4921.
- Hirai A., Tahara K., Tamura Y., Saito H., Terano T. y Yoshida S. 1985. *Prostaglandins* 30: 749-767.
- Hoffman K., Andreatta R., Bohn H. y Moroder L. 1970. *J. Med. Chem.* 13: 339-345.
- Hornsby P. 1988. The mechanism of action of ACTH in the adrenal cortex. *Hormones and their actions. Part II.* Elsevier Science Publisher BV. pág. 193-210.
- House C., Weltenhall R. y Kemp B. 1987. *J. Biol Chem* 262:772-777.
- Hume R., Kelly R., Taylor P., Boyd G. 1984. *European J. Biochem* 140: 583-591.
- Hunyady L., Balla T, Enyedi P. y Spat A. 1985. *Biochem. Pharmacol.* 34; 3439-3444.
- Iida S., Widmaier E. y Hall P. 1986. *Biochem J.* 236: 53-59
- Irvine R., 1982. *Biochem J.* 204: 3-16.
- Jain M. y Berg O. 1989. *Biochem. Biophys. Acta* 1002:127-156
- Jones D., Marante D., Williams C. y Edwards C. 1987. *J. Endocr.* 112: 253-258.
- Joseph S., Thomas A., Williams R., Irvine R. y Williamson J. 1984. *J. Biol. Chem.* 259: 3077-3081.
- Johnson E., Capponi A., Y Vallotton M. 1989. *J. of Endocrinology* 122:391-402.
- Kahnt F. y Neher R. 1962 *Experientia* 18: 499-501.
- Kahnt F. y Neher R. 1972. *Acta Endocrinol* 70: 315-330.
- Kahnt F., Milani A., Steffen H. & Neher R. 1974. *Eur. J. Biochem.* 44:243-250.
- Karaboyas G. y Koritz S. 1965. *Biochemistry* 4: 462-468.

- Keinanen K., Kellokumpu S., Metsikko M. y Rajaniemi H. 1987. J. Biol. Chem. 262: 7920-7927.
- King S., Ronen-Fuhrmann T., Timberg R., Clark B., Orly J. y Stocco D. 1995. Endocrinology 136: 5165-5176.
- Kojima I., Kojima K., Kreutter D y Rasmussen H. 1984 a. J. Biol. Chem. 259: 14448-14457
- Kojima K., Kojima I. y Rasmussen H. 1984 b. Am. J. Physiol. 247: E645-650.
- Kojima I., Kojima K. y Rasmussen H. 1985 a. Am. J. Physiol. 248: E36- E43.
- Kojima I., Kojima K. y Rasmussen H. 1985 b. J. Biol. Chem. 260: 4248-4256.
- Kojima I., Kojima K. y Rasmussen H. 1985 c. J. Biol. Chem. 260: 9171-9176.
- Kojima I., Kojima K. y Rasmussen H. 1985 d. J. Biol. Chem. 260: 9177-9184.
- Kojima I., Kojima K. y Rasmussen H. 1985 e. Endocrinology 117: 1057-1066.
- Kojima I., K Awamura N., y Shibata H. 1994. Biochem. J. 297:523-528.
- Kojima Y., Shibata M. y Ogata E. 1986. FEBS Letts. 204:347-351.
- Koritz S. y Kumar A. 1979. J. Biol. Chem.245: 152-159.
- Koshihara Y., Neichi T., Murota S., Lao A., Fujimoto Y. y Tatsumo S. 1983. FEBS Lett. 158: 41-46.
- Kowluru R., Yamazaki T., Mc Namara B. y Jefcoate C. 1995. Molec. and Cell. Endocrinology 107: 181-188.
- Kudo I., Murakami M., Hara S., y Inoue K. 1993. Biochem Biophys Acta 117: 217-231.
- Lang U., Vallotton M. 1987. J. Biol. Chem. 262: 8047-8053.
- Laychock S., Franson R., Neglicki W. y Rubin R. 1977. Biochem. J. 164:753-756.
- Leung P., y Steele G. 1992. Endocr. Reviews 13: 476-498.
- Levy H., Deane H.y Rubin B. 1959 J. Histochem. Cytochem. 7: 320-325.

- Li C. 1964. Introductiuon to Experimental Statistics. mc. Graw-Hill, New York.
- Lin D., Sugawara T., Strauss III J., Clark B., Stocco D., Saenger P., Rogol A. y Miller W. 1995. Science 269: 1828-1830.
- Lowitt S., Farese R., Sabir M ., y Root, A. 1982. Endocrinology 111: 1415-1417.
- Lowry O. , Rosebrough N. Farr A. y Randall R. 1951. J. Biol. Chem 193: 265-273.
- Luse S. 1967. Fine Structure of adrenal cortex En: The adrenal cortex Eisenstein A.B. (edt) Boston USA. Pag. 1-59.
- Mackie C., Richardson M. y Schulster D. 1972. FEBS Lett. 23: 345-348.
- Mandon E., GomezDumm I y Brenner R. 1986. Lipids 21: 401-404.
- Mc Kenna T., Island D., Nicholson W. y Liddle G. 1978. J. Steroid Biochem. 9: 967-972.
- Means A. 1975. En Handbook of Physiology (Greep R. y Astwood E. editores).Section 7, 5: 203-218. American Physiological Society, Washington.
- Mendelsohn F. 1985. J. Hypertens 3: 306-316.
- Mendelson C., Dufau M. y Katt K. 1975. J. Biol. Chem 250: 8818-8821.
- Metz S., Van Rollins R., Fujimoto W. y Robertson R. 1983. J. Clin. Invest. 71: 1191-1205.
- Mertz L. y Pedersen R. 1989. J. Biol. Chem. 265: 15274-15279.
- Mikami K., Omura M., Tamura Y. y Yoshida S. 1990. J. of Endocrinology 125: 89-96.
- Minegishi T., Delgado C., y Dufau M. 1989. Proc Natl. Acad. Sci. USA.86: 1470-1474
- Moger W. 1991. Endocrinology 128: 1414-1418.
- Mooradian A., Morley J. y Korenman S. 1987. Endocr. Rev. 8: 1-28.
- Muller J. 1971. Regulation of aldosterone biosynthesis. Springer. New York.

- Mukoyama M., Nakajima M., Sasamura H., Pratt R., y Dzau V. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 24539-24542.
- Murakami N., y Takahashi K. 1983. *Acta Endocrinol.* 102:583-588.
- Nadler , Natarajan R. y Stern N. 1987. *J. Clin. Invest.* 80: 1763-1769.
- Nakano A., Carvallo P., Rocco S. y Aguilera G. 1990. *Endocrinology* 126: 125-133.
- Naor Z. 1991. *Mol.Cel Endocrinology.* 80: C181-C186.
- Naor Z., Kiesel L., Vanderhock J. y Catt K. 1985 *J. Steroid Biochem.* 23: 711
- Natarajan R., Dunn W. Stern N., Nadler J. 1990. *Mol Cell Endocrinol* 72: 73-80.
- Natarajan R., Lanting L., Xu L. y Nadler J. 1994. *Mol Cell Endocrinol* 101: 59-66.
- Natarajan R., Stern N. y Nadler J. 1988. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156:717- 724.
- Needleman P., Turk J., Jakschik B., Morrison A y Lefkowitz J. 1986. *Ann. Rev. Biochem.* 55: 69-102.
- Neher R. y Milani A. 1978. *Mol. Cell Endocrinol.* 9: 243-253.
- Neher R., Milani A. , Solano A. y Podestá E. 1982. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 1727-1731.
- Ney R., Hochella N., Grahame-Smith D., Dexter R. y Bulcher R. 1969. *J. Clin. Invest.* 48: 1733-1739.
- Nishikawa T., Omura M., Noda M. , Yoshida S. 1994. *J. Biochem. (Tokyo)* 116: 833-837.
- Papadopoulos V., Widmaier E. y Hall P. 1990. *Endocrinology* 126: 2465-2473.
- Papadopoulos V.,Nowzari F., Kreuger K. y Hall P. 1991. *J. Biol. Chem.* 266: 3682-3687.
- Payet M., Benabderrazike M y Gallo Payet N. 1987. *Endocrinology* 121: 875-880.
- Pedersen R. y Brownie A. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1882-1886.

- Pedersen R. y Brownie A. 1987. *Science* 236: 180-190.
- Peitsch M., Borner C., y Tschopp J. 1993. *TIBS* 18: 292-293.
- Penhoat A., Jaillardc., y Saez J. 1993. *J. Steroid Biochem. and Mol. Biol.* 44: 21-27.
- Petaja-Repo U., Merz W. y Rajaniemi H. 1991. *Endocrinology* 128:1209-1217.
- Pfeifer S., Furth E., Ohba T., Chang Y, Rennert H., Sakuragi N., Billheimer J., y Strauss III J. 1993. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 47: 167-172.
- Perchellet J. y Sharma R. 1977. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 78: 676-683.
- Piomelli, D. y Greengard, P. 1991. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 6770-6774.
- Podestá E., Dufau M., y Catt K. 1976a. *Molec. Cell Endocrinol* 5: 109-122.
- Podestá E., Dufau M., y Catt K. 1976b. *FEBS letts.* 70: 212-216.
- Podestá E., Dufau M., Solano A. y Catt K. 1978. *J. Biol. Chem.* 235:8994-9001.
- Podestá E., Dufau M., y Catt K. 1978. *Biochemistry* 17:1566-1573.
- Podestá E., Milani A., Steffen H. y Neher R. 1979a. *Biochem. J.* 180: 355-363.
- Podestá E., Milani A., Steffen H. y Neher R. 1979 b. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5187-5191.
- Podestá E., Milani A., Steffen H. y Neher R. 1980. *Biochem J.* 186: 391-397.
- Podestá E., Solano A., Attar R., Sanchez M. y Molina y Vedia L. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 3986-3990.
- Podestá E., Solano A., Molina y Vedia L., Paladini A., Sanchez M. y Torres H. 1984. *Eur. J. Biochem.* 145: 329-332.
- Podestá E., Solano A. y Sanchez M. 1986. *Endocrinology* 119: 989-997.
- Podestá E., y Solano A. y Lemos J. 1991. *J. of Molec. Endocrinol* 6:269-279.
- Pon L., Hartigan J. y Roberts Orme - Johnson N. 1986. *J. Biol. Chem.* 261: 13309-13316.

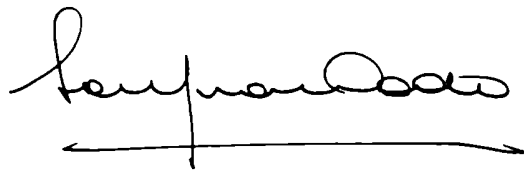
- Pon L. y Roberts Orme - Johnson N. 1988. *Endocrinology*. 123: 1942-1946.
- Privalle C., Crivello J., y Jefcoate C. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 702-706.
- Python C., Laban O., Rossier M., Vallotton M., Capponi A. 1995. *Biochemical J.* 305: 569-576.
- Qiu Z, Carvalho M., y Leslie C. 1993. *J. Biol. Chem.* 268: 24506-24513.
- Quinn S. Cornwall M. Williams G. 1987. *Endocrinology* 120: 903-914.
- Quinn S. y Williams G. 1988. *Annu. Rev. Physiol.* 50: 409-427.
- Rae P., Gutman U., Tsao J. y Schimmer B. 1979. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1896-1900.
- Raikhinstein M., Zohar M., y Hanukoglu I. 1994. *Biochem. Biophys. Acta.* 1994. 1220: 329-332.
- Ramachandran J. 1984. *Endocr. Res.* 10:347-363
- Rasmussen H., Takuwa Y. y Park S. 1987. *FASEB J.* 1:177-185.
- Richardson M. y Schulster D. 1973. *Biochem. J.* 136: 993-998.
- Rittenhouse S. y Horne W. 1984. *Biochem. Biophys. Research. Commun.* 123: 393-397.
- Roberts M., Deems M., Mincey T. y Dennis E. 1977. *J Biol. Chem.* 252: 2405-2411.
- Romanelli F., Valenca M., Conte D., Isidori A. y Negro Vilar A. 1995. *J. Endocrinol. Invest.* 18: 186-193.
- Roemmerts F., Cooke B., y van der Molen H. 1974. *J. Steroid Biochem.* 5:279-2859
- Saez J. 1994 *Endocr. Reviews* 15: 574-626.
- Sala G., Hayoshi K., Catt K. y Dufau M. 1979. *J. Biol. Chem.* 254: 3861-3865.
- Saruta T., Cook R., y Kaplan N. 1972. *J. Clin. Invest.* 51:2239-2245.
- Sasaki K., Yamano Y., Bardhan S., Iwai N., Murray J., Hasegawa M., Matsuda Y. y Inagami T. 1991. *Nature* 351: 230-233.

- Sayers G., Beall R., Seelig S. y Cummins K. 1973. En: Brain Pituitary- Adrenal Interrelationships editado por A. Brodich y E. Redgate, Basel: Karger, pág 16-35.
- Schimmer B. 1980. Adv. Cyclic Nucleotide Res 13: 181-214.
- Schimmer B. 1985. Methods in Endocrinology 109: 350-356.
- Schrey M. y Rubin R. 1979. J. Biol. Chem. 254: 11234-11241.
- Schwartz S. y Williams G. 1983. Endocrinology 113: 992-996.
- Schwyzer R., Schiller P., Seelig S. y Sayers G. 1971. FEBS Lett. 19: 229-231.
- Seelig S. y Sayers S. 1973. Arch. Biochem. Biophys. 154: 230-239.
- Seelig S., Sayers G., Schwyzer R. y Schiller P. 1971. FEBS Lett. 19: 232-234.
- Segaloff D. y Ascoli M. 1993. End. Rev. 14:324-347.
- Sekiya K., Okuda H. y Arichi S. 1982. Biochem. Biophys. Acta. 713: 68-72.
- Seybert D., Lancaster J., Lambeth J., y Kamin H. 1979. J. Biol. Chem. 254: 12088-12098.
- Sharma R., Ahmed N., Sutliff L. y Brush J. 1974. Eur. J. Biochem. 70: 427-433.
- Sharma R., Shanker G., Ahrens H. y Ahmed N. 1977. Cancer Res. 37: 3297-3300
- Shima S., Mitsunaga M., Kawashima Y, Taguchi S. y Nakoo T. 1974. Endocrinology 54: 650-654.
- Simpson E y Waterman M. 1988. Ann. Rev. Physiol. 50: 427-440.
- Skinner M. 1991. Endocr. Rev. 12: 45-77.
- Somlyo A., Bond M., Somlyo A. y Scarpa A. 1985. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 82: 5231-5235.
- Stern N., Yanagawa N., Saito F., Hori M., Natajara R., Nadler J. y Tuck M. 1993. Endocrinology 133: 843-847.
- Stocco D. y Sodeman T. 1991. J. Biol. Chem. 266: 19731-19738.
- Sullivan M. y Cooke B. 1985 Biochem. J. 230: 821-824.

- Sullivan M., y Cooke B. 1986. *Biochem. J.* 236:45-51.
- Sumners C., Tang W., Zelezna B., y Raizada M. 1991. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7567-7571.
- Sutherland E. y Rall T. 1958. *J. Biol. Chem.* 232: 1077-1091.
- Swallow. R. y Sayers G. 1969. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 131: 1-4.
- Swartz S. y Williams G. 1983. *Endocrinology* 113: 992-996.
- Sydnor K. y Sayers G. 1954 *Endocrinology* 55: 621-636.
- Tait J., Tait S., Albano J., Brown B. y Mendelson F. 1975 The response of purified zona glomerulosa cells of the rat adrenal to stimulation by K, serotonin, ACTH, angiotensine II and cAMP. in Breuer H., Hughes A., Conti C., Jungblut F., Lerner L. eds. *Research of steroids*, North Holland Publ. Co., p 15, Amsterdam.
- Tauton O., Roth J. y Pastan I. 1967. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 29: 1-7.
- Vahouny G., Chadberbhan R., Noland B., Irwin D., Dennis P., Lambeth J. y Scallen T. 1983. *J. Biol. Chem.* 258: 11731-11737.
- Van der Bosch H. 1980. *Biochem. Biophys. Acta* 604: 191-246.
- Van Noort M., Rommmerts F., Van Amerougen A, Wirtz K. 1988. *J. Endocrinology* 109: R13-R16.
- Van Wauwe J. y Goossens J. 1983. *Prostaglandins* 26: 725-730.
- Vilgrain I. Cochet C., Chambaz E. 1984. *J. Biol. Chem.* 3403-3410.
- Volwerk J., Pietersen W. y Haas G. 1974 *Biochemistry* 13: 1446-1451.
- Wang H., y Ascoli M. 1990. *Molec. Endocrin.* 4: 80-90
- Williams G., Braley L. 1977. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45: 55-64
- Whitebread S., Mele M., Kamber B., y de Gasparo M. 1989. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 284-291.
- Wightman P., Dahlgren M y Bonney R. 1982 *J. Biol. Chem.* 257, 6650-6652.

-Woodcock E., y Johnson C. 1984. Endocrinology 115: 337-341.

-Yamamoto R., Kallen C., Babalola G., Rennert H., Billheimer J., y Stauss J.III.
1991. Proc. Natl. Acad. Sci.USA. 88:463-467.

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "E. Woodcock". Below the signature is a long horizontal line with arrowheads at both ends.A handwritten signature in cursive script, appearing to read "J. Stauss".